

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2002-306169

(P2002-306169A)

(43)公開日 平成14年10月22日 (2002.10.22)

(51)Int.Cl. <sup>1</sup>	識別記号	F I	マーク(参考)
C 12 N 15/09	ZNA	A 6 1 K 39/00	J 4 B 0 2 4
A 6 1 K 39/00		39/39	4 B 0 6 3
39/39		48/00	4 B 0 6 4
48/00		A 6 1 P 31/04	4 B 0 6 5
A 6 1 P 31/04		1 7 1	4 C 0 8 4

審査請求 有 請求項の数44 OL (全32頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001-101364(P2001-101364)

(71)出願人 397067152

ファイザー・プロダクツ・インク

アメリカ合衆国コネチカット州グロトン市

イースタン・ポイント・ロード

(72)発明者 ケンドール ウェイン キング

アメリカ合衆国、コネチカット 06340,

グロトン、イースタン ポイント ロー

ド、ファイザー セントラル リサーチ

(74)代理人 100077517

弁理士 石田 敏 (外4名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】マイコプラズマ属のMycoplasma hyopneumoniaeのmhp3遺伝子の核酸  
およびタンパク質ならびにそれらの使用

(57)【要約】

【課題】Mycoplasma hyopneumoniae Mhp3遺伝子の核酸及びそれによりコードされるタンパク質の提供。

【解決手段】本発明は、Mycoplasma hyopneumoniaeによる感染により引き起こされる疾患の予防及び治療するためのワクチンにおいて使用されるmhp3によりコードされる新規のアボプロテイン抗原に関する。さらに；本発明は、上記抗原の粗挽えによる製造方法に関する。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号4の少なくとも30の連続したアミノ酸を含むアミノ酸配列を有するタンパク質であって、アミノ酸配列Trp Asp Lys Gluがその後に続く脂肪酸でアシル化されたシステインをもたず、かつ、C-末端ホモセリン・ラクトンをもたない、前記タンパク質。

【請求項2】 配列番号4の少なくとも50の連続したアミノ酸を含むアミノ酸配列を有する、請求項1に記載のタンパク質。

【請求項3】 配列番号4の少なくともアミノ酸1-30を含むアミノ酸配列を有するタンパク質。

【請求項4】 配列番号4を含むアミノ酸配列を有する、請求項3に記載のタンパク質。

【請求項5】 単離されたタンパク質である、請求項1, 2, 3又は4に記載のタンパク質。

【請求項6】 融合タンパク質である、請求項1に記載のタンパク質。

【請求項7】 前記融合タンパク質がチオレドキシン(thioredoxin)融合タンパク質である、請求項6に記載のタンパク質。

【請求項8】 請求項1, 2, 3又は4に記載のタンパク質、及び医薬として許容される担体を含む組成物。

【請求項9】 アジュバントをさらに含む、請求項8に記載の組成物。

【請求項10】 マイコプラズマ・ヒオニューモニエ(Mycoplasma hyopneumoniae)P46, P65, P97、及びP102から成る群から選ばれる少なくとも1のポリペプチドをさらに含む、請求項8に記載の組成物。

【請求項11】 その免疫原性タンパク質が、アミノ酸配列Trp Asp Lys Gluがその後に続く脂肪酸でアシル化されたシステインをもたず、かつ、C-末端ホモセリン・ラクトンをもたない、配列番号2に記載のアミノ酸配列を有する免疫原性タンパク質、又はその断片、変異体又は誘導体。

【請求項12】 その免疫原性タンパク質が、アミノ酸配列Trp Asp Lys Gluがその後に続く脂肪酸でアシル化されたシステインをもたず、かつ、C-末端ホモセリン・ラクトンをもたない、配列番号4に記載のアミノ酸配列を有する免疫原性タンパク質、又はその断片、変異体又は誘導体。

【請求項13】 マイコプラズマ・ヒオニューモニエによる感染により引き起こされる動物における病気又は失调を治療又は予防する方法であって、マイコプラズマ・ヒオニューモニエに特異的な細胞性又は体液性応答の上昇を顕示するために十分な量で、(i) 配列番号4の少なくとも30の連続したアミノ酸を含むアミノ酸配列を有するタンパク質であって、アミノ酸配列Trp Asp Lys Gluがその後に続く脂肪酸でアシル化されたシステインをもたないもの、及び(ii) 医薬として許容される担体、を含むワクチン製剤を上記動物に投与することを含む、

## 前記方法。

【請求項14】 前記タンパク質が、配列番号4の少なくとも50の連続したアミノ酸を含むアミノ酸配列を有する、請求項13に記載の方法。

【請求項15】 マイコプラズマ・ヒオニューモニエによる感染により引き起こされる動物における病気又は失调を治療又は予防する方法であって、マイコプラズマ・ヒオニューモニエに特異的な細胞性又は体液性応答の上昇を顕示するために十分な量で、(i) 配列番号4の少なくともアミノ酸1-30を含むアミノ酸配列を有する抗原性又は免疫原性タンパク質、及び(ii) 医薬として許容される担体を含むワクチン製剤を、上記動物に投与することを含む、前記方法。

【請求項16】 前記タンパク質が、配列番号4を含むアミノ酸配列を有する、請求項15に記載の方法。

【請求項17】 前記動物がブタである、請求項13, 14, 15又は16に記載の方法。

【請求項18】 配列番号2の少なくとも30の連続したアミノ酸を含むアミノ酸配列を有するタンパク質を、マイコプラズマ遺伝子コード内にコードする単離又は精製DNA又はその相補物。

【請求項19】 前記タンパク質が、配列番号2の少なくとも50の連続したアミノ酸を含む配列を有する、請求項18に記載のDNA。

【請求項20】 前記DNAが、配列番号1の少なくとも90の連続したヌクレオチドを含む配列を有する、請求項18に記載のDNA。

【請求項21】 配列番号4の少なくとも30の連続したアミノ酸を含むアミノ酸配列を有するタンパク質をユニバーサル遺伝子コード内にコードするDNA又はその相補物。

【請求項22】 前記タンパク質が、配列番号4の少なくとも50の連続したアミノ酸を含む配列を有する、請求項21に記載のDNA。

【請求項23】 前記DNAが、配列番号3の少なくとも90の連続したヌクレオチドを有する、請求項21に記載のDNA。

【請求項24】 異種プロモーターに作用可能な状態で連結された、請求項22に記載のDNA。

【請求項25】 原核細胞内で活性な複製起点をさらに含む、請求項24に記載のDNA。

【請求項26】 真核細胞内で活性な複製起点をさらに含む、請求項24に記載のDNA。

【請求項27】 請求項24に記載の単離DNAを含む宿主細胞。

【請求項28】 前記細胞が大腸菌(E.coli)BL21であり、そして前記DNAが、発現ベクターpBAD/Thio-TOPoである、請求項27に記載の宿主細胞。

【請求項29】 apo-Mhp3又はその断片の製造方法であって、apo-Mhp3が発現される条件下で請求項27に記載の

細胞を培養し、そして(ii)上記タンパク質を回収する、を含む、前記方法。

【請求項30】前記タンパク質が、可溶性形態で回収される、請求項29に記載の方法。

【請求項31】前記タンパク質が、不溶性の形態で回収される、請求項29に記載の方法。

【請求項32】マイコプラズマ・ヒオニュー・モニエによる感染により引き起こされる動物における病気又は失调を治療又は予防する方法であって、マイコプラズマ・ヒオニュー・モニエに特異的な細胞性又は体液性応答の上昇を顕出させるために十分な量で、(i)請求項20に記載のDNA、及び(ii)医薬として許容される担体を含むワクチン製剤を、上記動物に投与することを含む、前記方法。

【請求項33】前記動物がブタである、請求項32に記載の方法。

【請求項34】配列番号2の少なくとも5の連続したアミノ酸の配列を有するタンパク質をマイコプラズマ遺伝子コード内にコードするDNA又はその相補物に、PCRのためのストリージェント条件下で、ハイブリダイズする、15-40ヌクレオチドの断片を含む単離DNA。

【請求項35】前記ハイブリダイゼーションが、*M. hyopneumoniae*に特異的である、請求項34に記載の単離DNA。

【請求項36】配列番号2の少なくとも30の連続したアミノ酸の配列を有するタンパク質を、マイコプラズマ遺伝子コード内にコードするDNA又はその相補物に、フィルター・ハイブリダイゼーションのための高ストリンジング条件下で、ハイブリダイズする、少なくとも90ヌクレオチドの断片を含む単離DNA。

【請求項37】配列番号2の少なくとも5の連続したアミノ酸の配列を有するタンパク質を、マイコプラズマ遺伝子コード内にコードするDNAに、PCRのためのストリンジング条件下でハイブリダイズする、少なくとも15ヌクレオチドの断片を含む第1の単離DNA、並びに配列番号2の少なくとも5の連続したアミノ酸の配列を有するタンパク質をマイコプラズマ遺伝子コード内に、コードするDNAに相補的なDNAに、PCRのためのストリンジング条件下でハイブリダイズする、少なくとも15ヌクレオチドの断片を含む第2の単離DNAを、少なくとも1の容器内に含むキットであって、上記キットが*M. hyopneumoniae*感染の診断に有用であることを示す宣言文を含む、前記キット。

【請求項38】前記ハイブリダイゼーションが*M. hyopneumoniae*に特異的である、請求項37に記載のキット。

【請求項39】前記ハイブリダイゼーションが*M. hyopneumoniae*に特異的であり、かつ、前記キットが、*M. hyopneumoniae*感染の診断に有用であることを示す宣言文を含む、請求項34に記載の単離DNAを、少なくとも1の容器内に含むキット。

【請求項40】配列番号4の少なくとも30の連続したアミノ酸を含むアミノ酸配列を有するタンパク質、及び前記キットが*M. hyopneumoniae*感染の診断に有用であることを示す宣言文を、少なくとも1の容器内に含むキット。

【請求項41】抗-ブタ第2抗体をさらに含む、請求項40に記載のキット。

【請求項42】前記第2抗体が、比色計測反応を触媒する酵素にコンジュゲートされる、請求項41に記載のキット。

【請求項43】前記酵素が、アルカリ・ホスファターゼと西洋ワサビ・ペルオキシダーゼから成る群から選ばれる、請求項42に記載のキット。

【請求項44】比色計測アッセイのための試薬をさらに含む、請求項42に記載のキット。

#### 【発明の詳細な説明】

【0001】【技術分野】*mhp3*は、マイコプラズマ属のマイコプラズマ・ヒオニュー・モニエ (*Mycoplasma hyopneumoniae*) のタンパク質をコードする。本発明は、*mhp3*のヌクレオチドおよびタンパク質に関する。本発明はさらに、マイコプラズマ属の*Mycoplasma hyopneumoniae*による感染によって引き起こされる疾患を防止し、治療するためにワクチンに用いるための*mhp3*によりコードされる新規のアボタンパク質抗原に、そしてこのような抗原の組換え的産生のための方法に関する。

【0002】【発明の背景】マイコプラズマ属の*Mycoplasma hyopneumoniae* (*M. hyopneumoniae*) は、ブタの動物地方病マイコプラズマ肺炎を引き起こす細菌病原である。動物地方病マイコプラズマ肺炎は、貧飼料要求率、発育停止、ならびに二次肺感染に対する素因を生じる慢性疾患である。*M. hyopneumoniae*は、気道を通って、そして雌ブタ-子ブタ伝播により容易に伝播され、養豚場で大いに流行する。米国のブタ群の約99%が感染し、1991年の概算によれば年間約3億ドルをブタ産業は失っている。

【0003】*M. hyopneumoniae*を検出するための簡単な検査はなく、感染に対する有効な手段もない。*M. hyopneumoniae*の検出のための検査は、*M. hyopneumoniae*に対して向けられる抗体の他のブタマイコプラズマ種との交叉反応性により妨害されてきた。ワクチン分野はほとんどの部分に関して、*M. hyopneumoniae*の補助膜または全細胞調製物によっており、これらは有意の免疫応答を引き出していない。さらに、*M. hyopneumoniae*のクローニングおよび組換え発現は、ワクチン中の商業的使用のための十分に防御的であるタンパク質の生成に失敗している。

【0004】適切なワクチンがないために、動物地方病マイコプラズマ肺炎は、感染動物の早期検出および隔離によって大いに阻止されてきた。抗生物質による*M. hyopneumoniae*感染動物の治療は、感染経路の縮小にかなつ

ており、限定的成功を収めている。したがって、感染の防止または治療によるこの疾患の蔓延防止手段を見出すことは大いに必要である。防止のための一アプローチは、免疫感作である。したがって、ワクチン処方物中に用いるために *in vitro* で多量の抗原性 *M. hyopneumoniae* タンパク質またはペプチドを产生する能力は、予防的ワクチンの開発を大きく前進させる。

【0005】国際特許出願 W096/28472は、分子量46~48、52~54、60~64、72~75、90~94および110~114キロダルトンの *M. hyopneumoniae* の6つのタンパク質抗原種を同定し、52~54、60~64および72~75キロダルトン抗原の部分タンパク質配列、ならびに46~48キロダルトン抗原の全長ヌクレオチドおよびアミノ酸配列を開示する。本明細書中で以後P46と呼ばれる46~48キロダルトン抗原は、部分ペプチド配列についての Faulds よび Lee の開示に基づいて確定した場合、米国特許第5,252,328号 (Faulds) の44キロダルトン抗原および Lee (Lee et al., 1996, J. Chromatogr. A. 737:273-279) に記載された48キロダルトン抗原に対応する。P46をコードする遺伝子、即ちp46は、Futo等 (1995; J. Bacteriol. 177:1915-1917) によりクローニングされた。後に、同一グループは、*in vitro* 発現遺伝子生成物が、他のマイコプラズマ種との交差反応性を伴わない *M. hyopneumoniae* 感染の抗体応答を診断するのに有用であることを示した (Futo et al., 1995, J. Clin. Microbiol. 33:680-683)。Futo等が記載したp46遺伝子の配列および診断的使用は、欧洲特許公告 0 475 185A1 にも開示されている。

【0006】W096/28472の60~64キロダルトン抗原の部分ペプチド配列は、P102と呼ばれるタンパク質と有意の相同性を有する (下記参照)。さらに、本抗原は、Faulds (米国特許第5,252,328号) が開示した64キロダルトン抗原と有意の相同性を有する。W096/28472の72~75キロダルトン抗原は、WiseとKim (1987, J. Bacteriol., 169:5546-5555) および米国特許第5,788,962号) が開示した65キロダルトンタンパク質に対応し、本明細書中では以後P65と呼ばれる。

【0007】本明細書中で以後Mhp3と呼ばれる52~54キロダルトン抗原は、WiseとKim (1987, J. Bacteriol., 169:5546-5555) が記載した50キロダルトン内在性膜タンパク質および/またはFaulds (米国特許第5,252,328号) が開示した52キロダルトンタンパク質種に対応し得る。52~54キロダルトン抗原は、本明細書中では以後Mhp3と呼ばれる。W096/28472は、成熟タンパク質の、そして内部臭化シアン断片のアミノ末端の配列を開示する。

【0008】W096/28472の90~94キロダルトン抗原は、以下に記載される Hsu 等が開示した付着因子 p97 に対応し得る。W096/28472はさらに、60~64キロダルトン抗原、P46またはP65とMhp3の組合せを用いたワクチン試験の結果を開示する。予防接種は、*M. hyopneumoniae* 感染からの有意の防御を引き出した。

10 10 【0009】科学文献および特許文献中には、*M. hyopneumoniae* の外膜タンパク質に関する多数の報告がある。例えば、WiseとKim (1987, J. Bacteriol., 169:5546-5555) は、p70, p65 (P65、同上)、p50 および p44 と命名された *M. hyopneumoniae* には 4 つの内在性膜タンパク質種が存在し、そして後者 3 つは共有脂質結合により修飾されて、強力な体液性免疫応答を誘導するということを報告する。免疫応答の防御作用は、検査されなかった。P65 タンパク質をコードする遺伝子がクローニングされ、その配列、ならびに、例えばワクチンおよび診断におけるそれらの使用は米国特許第5,788,962号に記載されている。

【0010】国際特許公告 W091/15593 は、105、90、85、70 および 43 キロダルトンという見掛けの分子量の *M. hyopneumoniae* の 5 つのタンパク質を開示する。85 キロダルトンタンパク質 (タンパク質 C) をコードする遺伝子の全長配列が、他の 4 つのタンパク質をコードする部分ヌクレオチド配列と同様に提供された。タンパク質 C を用いたワクチン試験は、被験動物に *M. hyopneumoniae* に対する「有意の」防御をもたらした。

【0011】米国特許第5,252,328号 (Faulds) は、免疫反応性 *M. hyopneumoniae* タンパク質のアミノ末端配列、36、41、44、48、64、68、74.5、79、88.5、96 および 121 キロダルトンである分子量を開示する。電気泳動移動度に基づいて同定されたが、しかしタンパク質配列が開示されなかった他のタンパク質は、22.5、34 および 52 キロダルトンという見掛けの分子量を有した。米国特許第5,252,328号はワクチン処方物におけるこれらのタンパク質の使用を提案する一方で、ワクチン試験の結果は報告していない。

【0012】国際特許公告 W095/09870 は、宿主の上気道上皮の纖毛への付着に関与するマイコプラズマ内在性膜タンパク質である *M. hyopneumoniae* 付着因子の精製のための生化学的方法を開示する。W095/09870 は、例えばワクチンおよび診断におけるこれらのタンパク質の検定および使用も提案する。しかしながら、付着因子遺伝子のクローニングは、p97 と呼ばれる遺伝子がクローニングされ、本明細書中で以後「P97」と呼ばれるその生成物が *M. hyopneumoniae* 感染ブタの気道内の纖毛細胞と結合する生物体の能力にある役割を演じることが示されるまで、報告されなかった (Hsu et al., 1997, J. Bacteriol. 179:1317-1323)。King 等 (1997; Vaccine 15:25-35) による研究論文は、P97 の変異株である 124 キロダルトン付着因子 Mhp1 を開示した。しかしながら、GST-Mhp1 融合タンパク質を用いて *M. hyopneumoniae* に対してブタに予防接種する試みは、動物地方病マイコプラズマ肺炎に対する統計学的に有意の防御を生じなかった。P97 の 94 キロダルトン変異体は、Wilton 等 (1998, Microbiology 144:1931-1943) により同定された。さらに、p97 遺伝子は、約 102 キロダルトンの予測分子量を有する P102 と

呼ばれる二次タンパク質もコードするオペロンの一部であることが示された (Hsu et al., Gene 214:13-23)。MinionとHsuは、国際特許公告W099/26664でワクチン中のP102の使用を示唆しているが、しかしワクチン試験は報告していない。

【0013】[発明の要約] 本発明は、*M. hyopneumoniae* mhp3遺伝子のヌクレオチドおよびタンパク質を包含する。本発明は、*M. hyopneumoniae*による感染によって引き起こされる疾患を防止および治療するためにワクチン中に用いるためのmhp3遺伝子によりコードされる新規のアボタンパク質抗原も包含する。アポ-Mhp3の粗換え産生のための方法も提供される。

【0014】本発明は、配列番号2で記述されるようなアミノ酸配列を包含するポリペプチド、または少なくとも10、少なくとも20、少なくとも30、少なくとも40、少なくとも50または少なくとも100の連続アミノ酸から成るそのあらゆる断片、ならびに製薬上許容可能な担体を含有するワクチン処方物を提供する。ある実施態様では、ワクチンはさらに、少なくとも1つのその他の免疫原性または抗原性ポリペプチドを含有するが、この場合、その他のポリペプチドはウイルス、細菌または寄生生物起源であり得る。好ましい実施態様では、ワクチンはさらに、*M. hyopneumoniae* P46、P65、P97およびP102から成る群から選択される少なくとも1つのポリペプチド、ならびにその断片、変異体および誘導体を含有する。

【0015】本発明は、配列番号4に対応するアミノ酸配列を包含する抗原性または免疫原性ポリペプチド、あるいはそのあらゆる誘導体、変異体または断片を含有するワクチン処方物を提供する。好ましい実施態様では、抗原性または免疫原性ポリペプチドは、好ましくは発現ベクターpBAD/Thio-TOP10中でクローニングすることによりチオレドキシン融合タンパク質として発現され、そして大腸菌BL21菌株により產生される。非常に好ましい実施態様では、ワクチンはさらに、*M. hyopneumoniae* P4、6、P65、P97およびP102から成る群から選択される少なくとも1つのポリペプチド、ならびにその断片、変異体および誘導体を含有する。

【0016】本発明は、*M. hyopneumoniae*による感染によって引き起こされる動物における疾患または障害を治療または防止する方法であって、*M. hyopneumoniae*特異的細胞性または体液性応答の増大を引き出すのに十分な量で、配列番号2に対応するアミノ酸配列を包含する抗原性または免疫原性ポリペプチド、またはそのあらゆるアボ誘導体、変異体または断片、ならびに製薬上許容可能な担体を含有するワクチン処方物を被験者に投与することを包含する方法を提供する。好ましい実施態様では、アミノ酸配列は配列番号4で記述されるようなものである。別の好ましい実施態様では、動物はブタである。

【0017】本発明はさらに、*M. hyopneumoniae*の検出のためのキットを提供する。一実施態様では、キットは、*M. hyopneumoniae* Mhp3タンパク質に対する循環抗体の検出のための試薬を提供する。別の実施態様では、キットは、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) による、またはハイブリダイゼーション法による*M. hyopneumoniae*の検出のための試薬を提供する。本発明は、配列番号4の少なくとも30の連続アミノ酸を含むアミノ酸配列を有するタンパク質であって、脂肪酸アシル化システイン、その後のアミノ酸配列Trp Asp Lys Gluをもたず、かつ、C-末端ホモセリン・ラクトンをもたないものを提供する。1の態様においては、上記タンパク質は、配列番号4の少なくとも50の連続アミノ酸を含むアミノ酸配列を有する。他の態様においては、上記タンパク質は融合タンパク質である。さらなる態様においては、上記融合タンパク質は、チオレドキシン融合タンパク質である。本発明は、配列番号4の少なくともアミノ酸1-30を含むアミノ酸配列をもつタンパク質をも提供する。1の態様においては、上記タンパク質は、配列番号4を含むアミノ酸配列を有する。本発明は、単離タンパク質である、上記タンパク質の中のいずれかを提供する。本発明は、上記タンパク質の中のいずれか及び医薬として許容される担体を含む組成物をも提供する。1の態様においては、上記組成物は、さらに、アジュバントを含む。他の態様においては、上記組成物は、さらに、マイコプラズマ・ヒオニューモニエ (*Mycoplasma hyopneumoniae*) P46、P65、P97、及びP102から成る群から選ばれる少なくとも1のポリペプチドを含む。本発明は、配列番号2に示すアミノ酸配列を有する免疫原性タンパク質、又はその断片、変異体又は誘導体であって、その免疫原性タンパク質が、脂肪酸アシル化システイン、その後のアミノ酸配列Trp Asp Lys Gluを有さず、かつ、C-末端ホモセリン・ラクトンを有さないものを提供する。本発明は、配列番号4に示すアミノ酸配列を有する免疫原性タンパク質、又はその断片、変異体又は誘導体であって、その免疫原性タンパク質が、脂肪酸アシル化システイン、その後のアミノ酸配列Trp Asp Lys Gluを有さず、かつ、C-末端ホモセリン・ラクトンを有さないものを提供する。本発明は、マイコプラズマ・ヒオニューモニエによる感染により引き起こされる疾患又は失調を治療又は予防する方法であって、上記動物に、(i) 配列番号4の少なくとも30の連続アミノ酸を含むアミノ酸配列を有するタンパク質であって、脂肪酸アシル化システイン、その後のアミノ酸配列Trp Asp Lys Gluを有さないもの、及び(ii) 医薬として許容される担体、を含むワクチン製剤を、マイコプラズマ・ヒオニューモニエ特異的細胞性又は体液性応答における上昇を顯出するために十分な量で、投与することを含む前記方法を提供する。1の態様においては、上記50 タンパク質は、配列番号4の少なくとも50連続アミノ

酸を含むアミノ酸配列を有する。本発明は、マイコプラズマ・ヒオニューモニエによる感染により引き起こされる動物における疾患又は失調を治療又は予防する方法であって、上記動物に、(i)配列番号4の少なくともアミノ酸1-30を含むアミノ酸配列を有する抗原性又は免疫原性タンパク質、及び(ii)医薬として許容される担体、を含むワクチン製剤を、マイコアラズマ・ヒオニューモニエ特異的細胞性又は体液性応答における上昇を顕出するために十分な量で、投与することを含む前記方法を提供する。1の態様においては、上記タンパク質は、配列番号4を含むアミノ酸配列を有する。上記の方法の中のいずれかの1態様においては、上記動物はブタである。本発明は、配列番号2の少なくとも30の連続アミノ酸を含むアミノ酸配列を有するタンパク質を、マイコプラズマの遺伝子コードにおいて、コードする単離又は精製されたDNA、又はその相補体を提供する。1態様においては、上記タンパク質は、配列番号2の少なくとも50の連続アミノ酸を含む配列を有する。他の態様においては、上記DNAは、配列番号1の少なくとも90の連続ヌクレオチドを含む配列を有する。本発明は、配列番号4の少なくとも30の連続アミノ酸を含むアミノ酸配列を有するタンパク質を、ユニバーサル遺伝子コードにおいて、コードするDNA、又はその相補体を提供する。1の態様においては、上記タンパク質は、配列番号4の少なくとも50の連続アミノ酸を含む配列を有する。他の態様においては、上記DNAは、配列番号3の少なくとも90の連続ヌクレオチドを含む配列を有する。他の態様においては、上記DNAは、異種プロモーターに作用可能な状態で連結される。本発明においては、異種プロモーターに作用可能な状態で連結されたDNAは、単離DNAである。さらに他の態様においては、上記DNAの中のいずれか1は、さらに、原核細胞内で活性な複製起点を含む。他の態様においては、上記DNAの中のいずれか1は、さらに、真核細胞内で活性な複製起点を含む。本発明は、異種プロモーターに作用可能な状態で連結された上記DNAの中のいずれかを含む宿主細胞を提供する。1の態様においては、上記宿主細胞はE. coli BL21であり、そして上記DNAは、発現ベクターpBAD/Thio-TOPUである。本発明は、アポーMhp3又はその断片の製法であって、(i)アポーMhp3が発現される条件下で上記細胞を培養し、そして(ii)上記タンパク質を回収する、を含む前記製法を提供する。1の態様においては、上記タンパク質は、可溶性形態で回収される。他の態様においては、上記タンパク質は、不溶性形態で回収される。本発明は、マイコアラズマ・ヒオニューモニエによる感染により引き起こされる動物における疾患又は失調を治療し又は予防する方法であって、上記動物に、(i)上記DNAの中のいずれか、及び(ii)医薬として許容される担体、を含むワクチン製剤を、マイコアラズマ・ヒオニューモニエ特異的細胞性

10

又は体液性応答における上昇を顕出するために十分な量で、投与することを含む前記方法を提供する。1の態様においては、上記動物はブタである。本発明は、15~40ヌクレオチドの断片を含む単離DNAであって、その断片が、PCRのためのストリンジェント条件下、配列番号2の少なくとも5の連続アミノ酸から成る配列を有するタンパク質を、マイコアラズマの遺伝子コードにおいてコードするDNA又はその相補体に、ハイブリダイズする、前記単離DNAを提供する。1の態様においては、上記ハイブリダイゼーションは、M. hyopneumoniaeに特異的である。本発明は、少なくとも90ヌクレオチドの断片を含む単離DNAであって、その断片が、フィルター・ハイブリダイゼーションのための高ストリンジェント条件下、配列番号2の少なくとも30の連続アミノ酸の配列を有するタンパク質を、マイコアラズマの遺伝子コードにおいて、コードするDNA又はその相補体に、ハイブリダイズする、前記単離DNAを提供する。本発明は、少なくとも1の容器内に、少なくとも15ヌクレオチドから成る断片を含む第1単離DNAであって、その断片が、PCRのためのストリンジェント条件下、配列番号2の少なくとも5の連続アミノ酸の配列を有するタンパク質を、マイコアラズマの遺伝子コードにおいて、コードするDNA又はその相補体に、ハイブリダイズする前記第1単離DNA、並びに少なくとも15ヌクレオチドから成る断片を含む第2単離DNAであって、その断片が、PCRのためのストリンジェント条件下、配列番号2の少なくとも5の連続アミノ酸を有するタンパク質を、マイコアラズマの遺伝子コードにおいて、コードするDNAに相補的なDNAに、ハイブリダイズする前記第2単離DNAを含むキットであって、前記キットが、そのキットがM. hyopneumoniae感染の診断のために有用であることを示す言及を含む、前記キットを提供する。1の態様においては、上記ハイブリダイゼーションは、M. hyopneumoniaeに特異的である。他の態様においては、上記キットは、上記単離DNAの中のいずれかを少なくとも1の容器内に含み、ここで上記ハイブリダイゼーションがM. hyopneumoniaeに特異的であり、そして上記キットが、そのキットがM. hyopneumoniae感染の診断のために有用であることを示す言及を含む。本発明は、少なくとも1の容器内に、配列番号4の少なくとも30の連続アミノ酸を含むアミノ酸配列を有するタンパク質、及びそのキットがM. hyopneumoniae感染の診断のために有用であることを示す言及を含む、前記キットを提供する。1の態様においては、上記キットは、さらに、抗-ブタ第2抗体を含み、そしてさらなる態様においては、上記第2抗体は、比色計測反応を触媒する酵素に結合される。さらなる態様においては、上記酵素は、アルカリ・ホスファターゼ及びホースラディッシュ・ペルオキシダーゼから成る群から選ばれ、50 そして他のさらなる態様においては、上記キットは、さ

11

らに、比色計測アッセイのための試薬を含む。

【0018】〔略語および定義〕種名の前の略字M.は、マイコプラズマ属を示す。「組換え型Mhp3」という用語は、普遍的遺伝子コードでのMhp3抗原をコードする核酸を指す。「M. hyopneumoniae Mhp3」とは、M. hyopneumoniae遺伝子コードでのMhp3をコードする核酸を指す。M. hyopneumoniaeにおいては、コドンTGAは翻訳停止コドンというよりむしろトリプトファン残基を示す。したがって、組換え型Mhp3遺伝子は、TGAコドンの変わりにTGGコドンを有することによりM. hyopneumoniae Mhp3と異なる。

【0019】「Mhp3」という用語は、Mhp3遺伝子によりコードされるタンパク質を指す。アポタンパク質という用語は、例えば、脂質部分の受容体として機能するアミノ酸の欠失または突然変異により前記の脂質部分を欠いているタンパク質を示す。「ORF」という用語は、「オープン・リーディング・フレーム」、即ち遺伝子のコード領域を示す。

【0020】核酸およびポリペプチドに関する「配列同一性のパーセンテージ」は、比較ウインドウ全体の2つの最適整列配列を比較することにより確定されるが、この場合、最適アラインメントは最高序列相手を提供し、被験配列または参照配列への付加または欠失を導入し得る。同一性パーセンテージは、所定位置の被験および参照配列で同一であるアミノ酸のパーセンテージを算出することにより確定される。最適配列アラインメントおよび同一性パーセンテージは、筆算で、または好ましくはコンピューター算法、例えばTBLASTN、BLASTP、FASTA、TFASTA、GAP、BESTFITおよびCLUSTALWにより確定され得るが、これらに限定されない(Altschule et al., 1990, J. Mol. Biol. 215 (3) :403-10; Pearson and Lipman, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 (8) :2444-8; Thompson, et al., 1994, Nucleic Acids Res. 22 (22) :4673-80; Devereux et al., 1984, Nuc. Acids. Res. 12:387-395; Higgins, et al., 1996, Methods Enzymol. 266:383-402)。

【0021】好ましくは、デフォルトバラメーターで設定されたNCBI Blast Server (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) を用いて、配列同一性のパーセンテージを確定する。異種という用語は、プロモーターを説明するために本明細書で用いる場合には、プロモーターが、それが制御する発現のオープン・リーディング・フレームに対して生来でないことを示す。

【0022】「単離タンパク質」という用語は、単離タンパク質が少なくとも50重量%を構成するタンパク質の組成物を示す。さらに好ましくは、組成物は約95%、最も好ましくは99重量%の単離タンパク質を包含する。

「可溶性形態で回収される」という用語は、タンパク質またはポリペプチドが前記のタンパク質またはポリペプチドを発現する細胞の細胞質から取り戻されることを示す。

50

12

す。

【0023】「不溶性形態で回収される」という用語は、タンパク質またはポリペプチドが前記のタンパク質またはポリペプチドを発現する細胞中に存在する封入体から取り戻されることを示す。「機能的に等価」とは、本明細書中で用いる場合、Mhp3に特異的な抗体により認識され得るタンパク質、即ち内在性Mhp3タンパク質と実質的に同様の免疫学的応答を引き出し得るタンパク質を指す。したがって、機能的に等価のタンパク質に対して生じる抗体も、Mhp3を認識する。

【0024】「免疫原性」という用語は、特にタンパク質またはポリペプチドに対して向けられる免疫応答を引き出すタンパク質またはポリペプチドの能力を示す。

「抗原性」という用語は、抗体により免疫特異的にタンパク質またはポリペプチドに結合されるタンパク質またはポリペプチドの能力を指す。「防御」または「防御する」とは、ワクチンに関して本明細書中で用いる場合には、ワクチン中に用いられる抗原(単数または複数)が由来する生物体により引き起こされる疾患の症状をワクチンが防止または低減することを意味する。

【0025】「抗体」という用語は、本明細書中で用いる場合、抗原と結合し得るイムノグロブリン分子を指す。抗体は、ポリクローナル混合物またはモノクローナルであり得る。抗体は、天然供給源から、または組換え供給源から得られる無傷イムノグロブリンであり得るし、無傷イムノグロブリンの免疫反応性部分であり得る。抗体は、種々の形態で、例えばFab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>で、ならびに一本鎖で存在し得る。重鎖および軽鎖に関する遺伝子が單一コード配列に併合される一本鎖抗体も、用いられ得る。

【0026】「有効量」という用語は、それが投与される被験者における免疫応答を引き出すのに十分なMhp3ヌクレオチドまたはMhp3ポリペプチドの量を指す。免疫応答は、細胞性および/または体液性免疫の誘導を包含し得るが、これらに限定されない。「M. hyopneumoniae感染を治療または防止する」とは、M. hyopneumoniae細菌の複製を阻害し、M. hyopneumoniae伝播を阻害し、またはM. hyopneumoniaeがその宿主中にそれ自体を確立するのを阻止し、そしてM. hyopneumoniae感染により引き起こされる疾患の症状を軽減することを意味する。処置は、細菌負荷の低減、肺感染の低減および/または食物摂取および/または増殖の増大が認められる場合には、療法的であると考えられる。

【0027】「医薬として許容できる担体」とは、活性成分の生物学的活性の有効性を妨げない、化学的不活性な、そしてそれが投与される被験者に対して有毒でない担体媒質を指す。「治療薬」という用語は、細菌感染またはそれにより引き起こされる疾患の治療に手を貸すあらゆる分子、化合物または治療物質、好ましくは抗菌剤を指す。

【0028】[発明の詳しい説明] 本明細書中に記載したように、本発明人は、タンパク質と共有結合する脂質鎖によって *M. hyopneumoniae* の形質膜に結合されると考えられる *Mhp3* をコードする *M. hyopneumoniae* 遺伝子を発見し、特性化した。本発明は、信号鎖および脂質修飾に必要な信号を欠く *Mhp3* タンパク質を発現し、したがって *M. hyopneumoniae* による感染によって引き起こされる疾患に対するワクチンにそしてその治療に用いるための *Mhp3* の有効且つ高収率発現を可能にする組換え手段を提供する。

【0029】したがって、本発明は、*M. hyopneumoniae* *mhp3* によりコードされるタンパク質およびそのヌクレオチド配列を包含する。本発明はさらに、真正細菌および真核性宿主、例えばそれぞれ大腸菌およびバキュウロウイルスにおけるこのようなタンパク質の発現に適した普遍的遺伝子コードでこのようなタンパク質をコードする核酸を包含する。

【0030】本発明はさらに、配列番号4の少なくとも10、少なくとも20、少なくとも30、少なくとも40、少なくとも50または少なくとも100の連続アミノ酸から成る配列を有するタンパク質、ならびに普遍的遺伝子コードでこのようなタンパク質をコードする核酸を包含する。本発明はさらに、本発明のタンパク質および/または抗体を用いた *M. hyopneumoniae* により引き起こされる疾患の治療のための方法を包含する。

【0031】本発明はさらに、*Mhp3* タンパク質を含有するワクチン処方物を包含する。ある実施態様では、ワクチン処方物は、P46、P65、P97およびP102から成る群から選択される单離タンパク質、ならびにその断片、変異体および誘導体を含有する。開示を分かり易くするために、本発明の詳細な説明を以下のいくつかの項に分形質転換、本発明の特徴、実施態様または用途を記載または説明するが、本発明はこれらに限定されない。

#### 【0032】*mhp3* のヌクレオチド配列

本発明は、*mhp3* 遺伝子のヌクレオチド配列を包含する。それらの例には、他の *M. hyopneumoniae* 種に見出され得ると同様の *Mhp3* の種変異体をコードするヌクレオチド配列が含まれる。本発明の好ましい実施態様は、脂肪酸鎖の共有的負荷によっては修飾されず、したがって膜局在化されないアミノ切頭化形態の *Mhp3* タンパク質をコードするヌクレオチド配列を包含する。本発明の好ましい実施態様の一様式では、*Mhp3* のアミノ末端に対応する *mhp3* の 5' 欠失は、*Mhp3* のアミノ酸 2~29 をコードするヌクレオチド配列を包含する。本実施態様の他の様式では、*mhp3* の 5' 欠失は最初の 30、31~32 または 33~40 アミノ酸に対応する。

【0033】本発明は、マイコプラズマ遺伝子コードにおいて、配列番号2の少なくとも10、少なくとも20、少なくとも30、少なくとも40、少なくとも50または少なくとも100の連続アミノ酸を包含するアミノ酸配列を有す

るタンパク質をコードする单離または精製DNA、またはその相補体を提供する。本発明は、配列番号1の少なくとも90連続ヌクレオチドを包含する配列を有するDNA、またはその相補体も提供する。

【0034】本発明はさらに、配列番号4の少なくとも10、少なくとも20、少なくとも30、少なくとも40、少なくとも50または少なくとも100の連続アミノ酸を包含するアミノ酸配列を有するタンパク質を、普遍的遺伝子コードでコードするDNA、またはその相補体を提供する。本発明はさらに、配列番号3の配列を有するDNAを提供する。

【0035】本発明はさらに、15~40ヌクレオチドの断片を包含する单離DNAを提供するが、この断片は、PCRのための緊縮条件（下記と同様）下で、配列番号2の少なくとも5連続アミノ酸の配列を有するタンパク質を、マイコプラズマ遺伝子コードでコードするDNAまたはその相補体とハイブリダイズする。好ましい実施態様では、ハイブリダイゼーションは *M. hyopneumoniae* に特異的である。本明細書中で用いる場合、「*M. hyopneumoniae* に特異的なハイブリダイゼーション」とは、*M. hyopneumoniae* ゲノムとの、しかし関連するマイコプラズマ種、例えば *M. hyorhinis*、*M. flocculare*、*M. mycoides* などからのゲノムとではない選択的ハイブリダイゼーションを示す。

【0036】本発明はさらに、少なくとも90ヌクレオチドの断片を包含する单離DNAを提供するが、この断片は、フィルターハイブリダイゼーションのためのストリッジメント（緊縮）条件（下記と同様）下で、配列番号2の少なくとも30連続アミノ酸の配列を有するタンパク質を、マイコプラズマ遺伝子コードでコードするDNAまたはその相補体とハイブリダイズする。

【0037】特定の実施態様では、*mhp3* 核酸（例えば、配列番号1、配列番号3または配列番号5で記述されるような配列を有する）と、またはその相補体と、または *mhp3* 誘導体または類似体をコードする核酸と、またはその相補体と、低緊縮条件下で、ハイブリダイズ可能である核酸が提供される。例として、90ヌクレオチドに及ぶハイブリダイゼーションの領域のための低緊縮の条件を用いる手法を以下に示す（Shilo and Weinberg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78, 6789~6792も参考）。DNAを含有するフィルターを、35%ホルムアミド、5XSSC、50mMトリスHC1（pH7.5）、5mMEDTA、0.1%PVP、0.1%フィコール、1%BSA および 500μg/ml 变性サケ精子DNAを含有する溶液中で40°Cで6時間、前処理する。以下の変更を加えた同一溶液中で、ハイブリダイゼーションを実行する：0.02%PVP、0.02%フィコール、0.2%BSA、100μg/ml サケ精子DNA、10%（wt/vol）硫酸デキストランおよび 5~20X10<sup>6</sup> cpm<sup>32</sup>P-標識化プローブを用いる。フィルターを、ハイブリダイゼーション混合物中で40°Cで18~20時

15

間インキュベートし、次に、2XSSC、25 mMトリス-HCl (pH7.4)、5 mM EDTAおよび0.1% SDSを含有する溶液中で55°Cで1.5時間洗浄する。洗浄溶液を新鮮な溶液と取り換えて、60°Cでさらに1.5時間インキュベートする。フィルターを取り乾燥して、オートラジオグラフィー処理に曝露する。必要な場合には、フィルターを65~68°Cで1/3時間洗浄して、フィルムに再曝露する。用い得る低緊縮のその他の条件は、当業界で周知である（例えば、雑種ハイブリダイゼーションに用いられる）。

【0038】別の特定の実施態様では、高緊縮条件下で、mhp3核酸またはその相補体とハイブリダイズ可能な核酸が提供される。例として、90ヌクレオチドに及ぶハイブリダイゼーションの領域のための高緊縮の条件を用いる手法を以下に示す。DNAを含有するフィルターの予備ハイブリダイゼーションを、6XSSC、50 mMトリス-HCl (pH7.5)、1 mM EDTA、0.02% PVP、0.02% フィコール、0.02% BSAおよび500 μg/ml 変性サケ精子DNAから成る緩衝液中で、65°Cで8時間一夜、実行する。100 μg/ml 変性サケ精子DNAおよび5~20X10<sup>6</sup> cpm<sup>32</sup>P-標識化プローブを含有する予備ハイブリダイゼーション混合液中で、65°Cで48時間、フィルターをハイブリダイズする。フィルターの洗浄は、2XSSC、0.01% PVP、0.01% フィコールおよび0.01% BSAを含有する溶液中で37°Cで1時間実施する。この後に、0.1XSSC中で50°Cで45分間洗浄した後、オートラジオグラフィー処理する。

【0039】用い得るその他の高緊縮条件は、核酸の性質（例えば、長さ、GC含量等）およびハイブリダイゼーションの目的（検出、增幅等）によっており、当業界で周知である。例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）における約15~40塩基のオリゴヌクレオチドの相補配列との緊縮ハイブリダイゼーションは、以下の条件下で実行される：50 mM KClの塩濃度、10 mMトリス-HClの緩衝液濃度、1.5 mMのMg<sup>2+</sup>濃度、7~7.5のpHおよび55~60°Cのアニーリング温度。

【0040】別の特定の実施態様では、中等度緊縮条件下で、mhp3核酸またはその相補体とハイブリダイズ可能な核酸が提供される。このような緊縮のための適切な条件の選択は、当業界で周知である（例えば、Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York参照；Ausubel et al., eds., in the Current Protocols in Molecular Biology series of laboratory technique manuals, (c)1987-1997, Current Protocols, (c)1994-1997 John Wiley and Sons, Inc.も参照）。

【0041】mhp3コード化タンパク質の誘導体および類似体をコードする核酸、ならびにmhp3アンチセンス核酸が付加的に提供される。容易に明らかであるように、本

(9)

16

明細書中で用いる場合、「mhp3コード化タンパク質の断片または一部をコードする核酸」は、説明済みのmhp3コード化タンパク質の断片または一部だけをコードし、連続配列としてのmhp3コード化タンパク質の他の連続部分をコードしない核酸を参照しながら構築される。

【0042】好ましい特定の実施態様では、ハイブリダイゼーション後、洗浄条件は以下の通りである。各膜は、40 mMリン酸ナトリウム、pH7.2、5% SDS、1 mM EDTA、0.5% ウシ血清アルブミン中で45°Cで2回、  
10 各30分間洗浄され、その後リン酸ナトリウム、pH7.2、1% SDS、1 mM EDTA中で4回、各々30分間洗浄されて、その後、各膜は、低、中または高緊縮ハイブリダイゼーション条件に関して以下に記載するように別様に処理される。低緊縮ハイブリダイゼーションに関しては、膜はそれ以上洗浄されない。中緊縮ハイブリダイゼーションに関しては、膜はさらに、40 mMリン酸ナトリウム、pH7.2、1% SDS、1 mM EDTA中で55°Cで4回、各々30分間の洗浄を施される。高緊縮ハイブリダイゼーションに関しては、低緊縮に関する洗浄後、膜はさらに、40 mMリン酸ナトリウム、pH7.2、1% SDS、1 mM EDTA中で55°Cで4回、各々30分間の洗浄を施される。

【0043】mhp3コード化タンパク質およびポリペプチド

本発明は、組換えMhp3タンパク質を提供する。一実施態様では、タンパク質は、配列番号4の少なくとも10、少なくとも20、少なくとも30、少なくとも40、少なくとも50または少なくとも100の連続アミノ酸から成るアミノ酸配列を有し、脂肪酸部分と共有結合しない。さらに別の実施態様では、タンパク質は単離タンパク質である。本発明は、このようなMhp3タンパク質を含有する組成物も提供する。ある特定の実施態様では、組成物はMhp3タンパク質および製薬上許容可能な担体、またはMhp3タンパク質およびアジュバントを含有する。別の特定の実施態様では、組成物は、M. hyopneumoniaeの少なくとも1つのその他のタンパク質、例えばP64、P65、P97またはP102を含有するが、これらに限定されない。その他の実施態様では、組成物は、Mhp3タンパク質、ならびにM. hyopneumoniaeポリペプチドでなく、好ましくはウイルス、細菌または寄生生物ポリペプチドである少なくとも1つのその他の免疫原性または抗原性ポリペプチドを含有する。このような組成物は、混合ワクチンとして有益である。

【0044】さらに、ワクチン調製に用いるための本発明のMhp3タンパク質は、実質的に純粋であるかまたは均質である。当業者に周知の方法、例えば標本のポリアクリルアミドゲル電気泳動とその後の染色ゲル上での单一ポリペプチドバンドの可視化を用いて、タンパク質純度

50

または均質性を確定し得る。HPLCまたは当業界で周知のその他の同様の方法を用いて、より高度の分解能が確定され得る。

【0045】本発明は、これらのタンパク質をコードする組換えヌクレオチド配列を発現する宿主細胞から典型的には精製されるポリペプチドを包含する。このようなタンパク質精製は、当業界で周知の種々の方法により成し遂げられ得る。一実施態様では、本発明のMhp3タンパク質は、例えばチオレドキシンとの融合タンパク質として発現される。その結果生じる組換え融合タンパク質は、アフィニティークロマトグラフィーにより精製され得る。その実施態様の一様式では、Mhp3タンパク質は異種部分から切り離されて、実質的に純粋なMhp3タンパク質標本を生じる。その他の方法も用い得る（例えば、"Methods in Enzymology", 1990, Academic Press, Inc., San Diego, "Protein Purification: Principles and Practice", 1982, Springer-Verlag, New Yorkに記載された技法を参照）。

#### 【0046】発現系

本発明は、Mhp3タンパク質の切頭型および全長形態の療法を発現するために用いられ得る発現系、即ち真核細胞性および原核細胞性発現ベクターの両方を包含する。本発明の好ましい実施態様では、核酸は配列番号3の配列を有し、配列番号2の残基30-444を含有する配列番号4のタンパク質をコードする。M. hyopneumoniaeのTGAコドンは、TGGコドンに変えられている。

【0047】種々の宿主発現ベクター計は、本発明の抗原タンパク質配列を発現するために利用され得る。このような宿主発現系は、それにより当該コード配列が產生され、その後精製されうるビヒクルを表すが、しかし適切なヌクレオチドコード配列で形質転換またはトランسفェクトされる場合に、in-situで本発明のMhp3遺伝子生成物を示す細胞を表す。これらの例としては、微生物、例えばMhp3コード配列を含有する組換えバクテリオファージDNA、プラスミドDNAまたはコスミドDNA発現ベクターで形質転換された細菌（例えば、大腸菌、枯草菌）；Mhp3遺伝子生成物コード配列を含有する組換え酵母菌発現ベクターで形質転換された酵母菌（例えば、サッカロミセス属、ビチア属）；Mhp3コード配列を含有する組換えウイルス発現ベクター（例えばバキュウロウイルス）に感染した昆虫細胞系；組換えウイルス発現ベクター（例えばカリフラワーモザイクウイルス、CaMV、タバコモザイクウイルス、TMV）に感染した、あるいはMhp3コード配列を含有する組換えプラスミド発現ベクター（例えば、Tiプラスミド）で形質転換された植物細胞系；あるいは哺乳類細胞のゲノム由来のプロモーター（例えば、メタロチオネインプロモーター）、または哺乳類ウイルス由来のプロモーター（例えば、アデノウイルス後期プロモーター；ワクシニアウイルス7.5Kプロモーター）を含有する組換え発現構築物を

保有する哺乳類細胞系（例えば、COS、CHO、BHK、293、3T3）が挙げられるが、それらに限定されない。

【0048】好ましい実施態様では、発現系は細菌系である。多数の発現ベクターは、有益には、発現されているMhp3生成物に関して意図される使用によって選択され得る。例えば、多量のこのようなタンパク質が產生されるものである場合、Mhp3の製剤組成物の精製のために、またはMhp3に対する抗体を生じるためには、例えば、容易に精製される高レベルの融合タンパク質生成物の発現を指図するベクターが望ましい。好ましくは、ベクターは、誘導可能な遺伝子発現を指図するプロモーターを含有する。適切なベクターとしては、融合タンパク質が產生されるように、lac Zコード領域を有する枠内でMhp3コード配列が別々にベクターに結合され得る大腸菌発現ベクターpUR278 (Ruther et al., 1983, EMBO J. 2:1791)；pINベクター (Inouye & Inouye, 1985, Nucleic Acids Res. 13:3101-3109; Van Heeke & Schuster, 1989, J. Biol. Chem. 264:5503-5509)；Mhp3コード配列が枠内で多数の（例えば6つの）ヒスチジン残基と融合され得るpETベクター (Studier and Mofatt, 1986, J. Mol. Biol. 189:113; Rosenberg et al., 1987, Gene 6:125-135；ベクターはNovagen, Madison, Wisconsinから入手可能である）；これを用いてMhp3がアラビノース誘導性タンパク質の制御下で発現され得るpBADベクター (Guzman et al., 1995, J. Bact. 177:4121-4130) が挙げられるが、これらに限定されない。pGEXベクター (Promega Corporation) も、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) を用いて融合タンパク質として外来ポリペプチドを発現するために用いられ得る。概して、このような融合タンパク質は可溶性であり、そしてグルタチオン-アガロースビーズへの吸着とその後の遊離グルタチオンの存在下での溶離により溶解細胞から容易に精製され得る。pGEXベクターは、クローン化標的遺伝子生成物がGST部分から放出され得るように、トロンビンまたはXa因子プロテアーゼ切断部位を含有するよう設計される。Mhp3配列は入発現ベクター中にクローン化され、入-細菌株中で発現され得る。本実施態様の好ましい様式では、細菌株は、入ベクターからのタンパク質発現が30°Cでは抑制されるがしかし42°Cでは活性であるよう、温度感受性入アレッサーを含有するLW14である。非常に好ましい実施態様では、ベクター-Mhp3は、普通は不溶性であるタンパク質の溶解性を促進するチオレドキシン融合タンパク質として発現される。チオレドキシン-Mhp3融合タンパク質は、好ましくは、Mhp3'コード配列をpBADベクター-pBAD/Thio-TOPO (Invitrogen Corporation, Carlsbad, California) に結合することにより発現される。本実施態様の非常に好ましい様式では、チオレドキシン-Mhp3融合タンパク質は、大腸菌BL21菌株中で発現される。その他のベクターが用いられ得

が枠内で多數の（例えば6つの）ヒスチジン残基と融合され得るpETベクター (Studier and Mofatt, 1986, J. Mol. Biol. 189:113; Rosenberg et al., 1987, Gene 6:125-135；ベクターはNovagen, Madison, Wisconsinから入手可能である）；これを用いてMhp3がアラビノース誘導性タンパク質の制御下で発現され得るpBADベクター (Guzman et al., 1995, J. Bact. 177:4121-4130) が挙げられるが、これらに限定されない。pGEXベクター (Promega Corporation) も、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) を用いて融合タンパク質として外来ポリペプチドを発現するために用いられ得る。概して、このような融合タンパク質は可溶性であり、そしてグルタチオン-アガロースビーズへの吸着とその後の遊離グルタチオンの存在下での溶離により溶解細胞から容易に精製され得る。pGEXベクターは、クローン化標的遺伝子生成物がGST部分から放出され得るように、トロンビンまたはXa因子プロテアーゼ切断部位を含有するよう設計される。Mhp3配列は入発現ベクター中にクローン化され、入-細菌株中で発現され得る。本実施態様の好ましい様式では、細菌株は、入ベクターからのタンパク質発現が30°Cでは抑制されるがしかし42°Cでは活性であるよう、温度感受性入アレッサーを含有するLW14である。非常に好ましい実施態様では、ベクター-Mhp3は、普通は不溶性であるタンパク質の溶解性を促進するチオレドキシン融合タンパク質として発現される。チオレドキシン-Mhp3融合タンパク質は、好ましくは、Mhp3'コード配列をpBADベクター-pBAD/Thio-TOPO (Invitrogen Corporation, Carlsbad, California) に結合することにより発現される。本実施態様の非常に好ましい様式では、チオレドキシン-Mhp3融合タンパク質は、大腸菌BL21菌株中で発現される。その他のベクターが用いられ得

が枠内で多數の（例えば6つの）ヒスチジン残基と融合され得るpETベクター (Studier and Mofatt, 1986, J. Mol. Biol. 189:113; Rosenberg et al., 1987, Gene 6:125-135；ベクターはNovagen, Madison, Wisconsinから入手可能である）；これを用いてMhp3がアラビノース誘導性タンパク質の制御下で発現され得るpBADベクター (Guzman et al., 1995, J. Bact. 177:4121-4130) が挙げられるが、これらに限定されない。pGEXベクター (Promega Corporation) も、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) を用いて融合タンパク質として外来ポリペプチドを発現するために用いられ得る。概して、このような融合タンパク質は可溶性であり、そしてグルタチオン-アガロースビーズへの吸着とその後の遊離グルタチオンの存在下での溶離により溶解細胞から容易に精製され得る。pGEXベクターは、クローン化標的遺伝子生成物がGST部分から放出され得るように、トロンビンまたはXa因子プロテアーゼ切断部位を含有するよう設計される。Mhp3配列は入発現ベクター中にクローン化され、入-細菌株中で発現され得る。本実施態様の好ましい様式では、細菌株は、入ベクターからのタンパク質発現が30°Cでは抑制されるがしかし42°Cでは活性であるよう、温度感受性入アレッサーを含有するLW14である。非常に好ましい実施態様では、ベクター-Mhp3は、普通は不溶性であるタンパク質の溶解性を促進するチオレドキシン融合タンパク質として発現される。チオレドキシン-Mhp3融合タンパク質は、好ましくは、Mhp3'コード配列をpBADベクター-pBAD/Thio-TOPO (Invitrogen Corporation, Carlsbad, California) に結合することにより発現される。本実施態様の非常に好ましい様式では、チオレドキシン-Mhp3融合タンパク質は、大腸菌BL21菌株中で発現される。その他のベクターが用いられ得

が枠内で多數の（例えば6つの）ヒスチジン残基と融合され得るpETベクター (Studier and Mofatt, 1986, J. Mol. Biol. 189:113; Rosenberg et al., 1987, Gene 6:125-135；ベクターはNovagen, Madison, Wisconsinから入手可能である）；これを用いてMhp3がアラビノース誘導性タンパク質の制御下で発現され得るpBADベクター (Guzman et al., 1995, J. Bact. 177:4121-4130) が挙げられるが、これらに限定されない。pGEXベクター (Promega Corporation) も、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) を用いて融合タンパク質として外来ポリペプチドを発現するために用いられ得る。概して、このような融合タンパク質は可溶性であり、そしてグルタチオン-アガロースビーズへの吸着とその後の遊離グルタチオンの存在下での溶離により溶解細胞から容易に精製され得る。pGEXベクターは、クローン化標的遺伝子生成物がGST部分から放出され得るように、トロンビンまたはXa因子プロテアーゼ切断部位を含有するよう設計される。Mhp3配列は入発現ベクター中にクローン化され、入-細菌株中で発現され得る。本実施態様の好ましい様式では、細菌株は、入ベクターからのタンパク質発現が30°Cでは抑制されるがしかし42°Cでは活性であるよう、温度感受性入アレッサーを含有するLW14である。非常に好ましい実施態様では、ベクター-Mhp3は、普通は不溶性であるタンパク質の溶解性を促進するチオレドキシン融合タンパク質として発現される。チオレドキシン-Mhp3融合タンパク質は、好ましくは、Mhp3'コード配列をpBADベクター-pBAD/Thio-TOPO (Invitrogen Corporation, Carlsbad, California) に結合することにより発現される。本実施態様の非常に好ましい様式では、チオレドキシン-Mhp3融合タンパク質は、大腸菌BL21菌株中で発現される。その他のベクターが用いられ得

が枠内で多數の（例えば6つの）ヒスチジン残基と融合され得るpETベクター (Studier and Mofatt, 1986, J. Mol. Biol. 189:113; Rosenberg et al., 1987, Gene 6:125-135；ベクターはNovagen, Madison, Wisconsinから入手可能である）；これを用いてMhp3がアラビノース誘導性タンパク質の制御下で発現され得るpBADベクター (Guzman et al., 1995, J. Bact. 177:4121-4130) が挙げられるが、これらに限定されない。pGEXベクター (Promega Corporation) も、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) を用いて融合タンパク質として外来ポリペプチドを発現するために用いられ得る。概して、このような融合タンパク質は可溶性であり、そしてグルタチオン-アガロースビーズへの吸着とその後の遊離グルタチオンの存在下での溶離により溶解細胞から容易に精製され得る。pGEXベクターは、クローン化標的遺伝子生成物がGST部分から放出され得るように、トロンビンまたはXa因子プロテアーゼ切断部位を含有するよう設計される。Mhp3配列は入発現ベクター中にクローン化され、入-細菌株中で発現され得る。本実施態様の好ましい様式では、細菌株は、入ベクターからのタンパク質発現が30°Cでは抑制されるがしかし42°Cでは活性であるよう、温度感受性入アレッサーを含有するLW14である。非常に好ましい実施態様では、ベクター-Mhp3は、普通は不溶性であるタンパク質の溶解性を促進するチオレドキシン融合タンパク質として発現される。チオレドキシン-Mhp3融合タンパク質は、好ましくは、Mhp3'コード配列をpBADベクター-pBAD/Thio-TOPO (Invitrogen Corporation, Carlsbad, California) に結合することにより発現される。本実施態様の非常に好ましい様式では、チオレドキシン-Mhp3融合タンパク質は、大腸菌BL21菌株中で発現される。その他のベクターが用いられ得

るが、それらは当業者には既知である。

【0049】Mhp3抗体

本発明によれば、Mhp3コード化タンパク質ならびにそれらの誘導体および類似体が免疫原として用いられて、このような免疫原を免疫特異的に結合する抗体を生成し得る。Mhp3に対するポリクローナル抗体の產生のためにには、当業界で既知の種々の手法が用いられ得る。抗体の產生のために、天然Mhp3タンパク質、または合成バージョン、またはその誘導体の注入により種々の宿主動物、例えばウサギ、マウス、ラット等（これらに限定されない）が免疫感作され得る。宿主種によって免疫学的応答を増大するために、種々のアジュバントが用いられ得る（例えば、ワクチンの調製に用いられるもの）。

【0050】Mhp3コード化タンパク質配列またはその類似体に向けられるモノクローナル抗体の調製のために、培養中の連続細胞株による抗体分子の產生を提供するあらゆる技法が用いられ得る。例えば、KohlerとMilsteinにより最初に開発されたハイブリドーマ法（Kohler and Milstein 1975, *Nature* 256:495-497）、ならびにトリオマ法、ヒトB細胞ハイブリドーマ法（Kozbor et al., 1983, *Immunology Today* 4:72）およびヒトモノクローナル抗体を產生するためのEBV-ハイブリドーマ法（Cole et al., 1985, in *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96）。本発明のさらに別の実施態様では、モノクローナル抗体は、最新技法を利用して無菌動物中で產生され得る（例えば、PCT/US90/02545参照）。本発明によれば、ヒト抗体が用いられ、ヒトハイブリドーマを用いることにより（Cole et al., 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 80:2026-2030）、またはヒトB細胞をin vitroでEBVウイルスで形質転換することにより（Cole et al., 1985, in *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, pp. 77-96）得られる。実際、本発明によれば、Mhp3コード化タンパク質に特異的なマウス抗体分子からの遺伝子を適切な生物学的活性を有するヒト抗体分子からの遺伝子と一緒にスプライシングすることによる、「キメラ抗体」（Morrison et al., 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81:6851-6855; Neuberger et al., 1984, *Nature* 312:604-608; Takeda et al., 1985, *Nature* 314:452-454）の產生のために開発された技法が用いられ得る。このような抗体は本発明の範囲内である。

【0051】本発明によれば、一本鎖抗体の產生に関して記載された技法（米国特許第4,946,778号）は、Mhp3遺伝子生成物特異一本鎖抗体を產生するために適応され得る。本発明のさらに別の実施態様は、Fab'発現ライブラリー（Huse et al., 1989, *Science* 246:1275-1281）の構築に関して記載された技法を利用して、Mhp3コード化タンパク質、誘導体または類似体に対する所望の特異性を有するモノクローナルFab断片の迅速且つ

容易な同定を可能にする。

【0052】イディオタイプの分子を含有する抗体断片は、既知の技法により生成され得る。例えば、このような断片としては、抗体分子のペプチド真消化により產生され得るF(ab')2断片、F(ab')2断片のジスルフィド橋を還元することにより生成され得るFab'断片、ババインおよび還元剤で抗体分子を処理することにより生成されるFab断片、ならびにFv断片が挙げられるが、これらに限定されない。

【0053】抗体の產生に際しては、当業界で既知の技法（例えば、酵素結合イムノソルベント検定またはELISA）により、所望の抗体に関するスクリーニングが成し遂げられ得る。例えば、Mhp3コード化タンパク質の特定のドメインを認識する抗体を選択するために、このようなドメインを含有するMhp3断片と結合する物質に関して生成されたハイブリドーマが検定され得る。一次Mhp3同族体を特異的に結合するがしかし異なるMhp3同族体は特異的に結合しない抗体の選択のためには、一次Mhp3同族体との陽性結合および二次Mhp3同族体との結合の欠乏を基礎にして選択が成され得る。

【0054】Mhp3コード化タンパク質のドメインに特異的な抗体も提供される。Mhp3コード化タンパク質のエピトープに特異的な抗体も提供される。前記の抗体は、本発明のMhp3コード化タンパク質配列の局在化および活性に関連する当業界で既知の方法、例えば適切な生理学的標本中、診断方法、免疫療法等におけるそのレベルの測定に用いられ得る。

【0055】Mhp3キット

本発明はさらに、*M. hyopneumoniae*の検出のためのキットを提供する。一実施態様では、キットは、*M. hyopneumoniae* Mhp3タンパク質に対する循環抗体の検出のための試薬を提供する。ある実施態様では、キットは、*M. hyopneumoniae*感染の診断にキットが有用であることを示す一文を包含する。最低限、キットは少なくとも1つの容器中に、配列番号4の少なくとも30連続アミノ酸を包含するアミノ酸を有するタンパク質を含有する。本実施態様の一様式では、キットはさらに、抗ブタ二次抗体を包含する。本実施態様の好ましい様式では、二次抗体は、比色反応を触媒する酵素、例えばアルカリ性ホスファーゼまたはホースラディッシュペルオキシダーゼに接合される。本実施態様のさらに別の様式では、キットはさらに比色検定のための試薬を包含する。

【0056】別の実施態様では、キットは、*M. hyopneumoniae*核酸の検出のための試薬を提供する。本実施態様の一様式では、キットは*M. hyopneumoniae*核酸のPCR検出のための試薬を提供し、少なくとも1つの容器中に、配列番号2の少なくとも5連続アミノ酸の配列を有するタンパク質を、マイコプラズマ遺伝子コードで、コードするDNAと緊縮条件下でハイブリダイズする少なくとも15ヌクレオチドの断片を含有する一次単離DN

21

A、ならびに配列番号2の少なくとも5連続アミノ酸の配列を有するタンパク質を、マイコプラズマ遺伝子コードで、コードするDNAと相補的なDNAと緊縫条件下でハイブリダイズする少なくとも15ヌクレオチドの断片を含有する二次単離DNAを包含する。本実施態様の別の様式では、キットは、*M. hyopneumoniae*ゲノムの検出のためのハイブリダイゼーションベースの方法を提供し、少なくとも1つの容器中に、配列番号2の少なくとも5連続アミノ酸の配列を有するタンパク質を、マイコプラズマ遺伝子コードで、コードするDNAと緊縫条件下でハイブリダイズする少なくとも15ヌクレオチドの断片を含有する単離DNA、または前記のDNAの相補体を包含し、この場合、ハイブリダイゼーションは*M. hyopneumoniae*に特異的である。本明細書中で用いる場合、「*M. hyopneumoniae*に特異的なハイブリダイゼーション」とは、*M. hyopneumoniae*ゲノムに対しては選択的ハイブリダイゼーションであるが関連マイコプラズマ種、例えば*M. hyorhinis*、*M. flocculare*、*M. mycoidea*等からのゲノムに対してはそうでないハイブリダイゼーションを示す。

#### 【0057】ワクチン処方物および投与方法

本発明のMhp3タンパク質抗原は大量に產生され得るため、このようにして產生され、精製された抗原は、ワクチン調製に用途を有する。Mhp3タンパク質は、例えば予防接種された、または感染した可能性がある被験動物からの体液の標本中で、抗原に対する抗体の存在を検出し、したがって動物の免疫応答をモニタリングするかおよび/または感染を診断するためのイムノアッセイにおける効用を有する。

【0058】活性成分として免疫原性ポリペプチドを含有するワクチンの調製は、当業者には既知である。

#### ワクチン効能の確定

Mhp3抗原の免疫効力は、Mhp3抗原を、単独でまたは少なくとも1つの他のポリペプチドと組合せてもちいて、免疫感作後に被験動物における免疫応答をモニタリングすることにより、または当業界で既知のあらゆるイムノアッセイの使用により、確定され得る。好ましい実施態様では、前記の他のポリペプチドは、*M. hyopneumoniae* P46、P65、P97およびP102タンパク質から成る群から選択される。体液性（抗体）応答および/または細胞媒介性免疫の生成は、免疫応答の指標と解釈され得る。

【0059】ワクチンの導入方法としては、経口、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内、皮下、鼻腔内または免疫感作のあらゆるその他の標準経路が挙げられる。被験対象の免疫応答は、種々のアプローチ：例えば、既知の技法、例えばイムノソルベント検定（ELISA）、イムノプロット、放射性免疫沈降等により検定されるよう、Mhp3抗原に対して結果的に生じる免疫血清の反応性により、あるいはMhp3抗原が抗原性または免疫原性を示

22

す場合には、*M. hyopneumoniae*による感染からの免疫感作宿主の防御および/または免疫感作宿主における*M. hyopneumoniae*による感染のための症状の軽減により分析され得る。

#### 【0060】ワクチン処方物

本発明のワクチンは、組換えMhp3および/またはその断片、変異体および誘導体を包含する。ある実施態様では、本発明のワクチンはMhp3および少なくとも1つのその他の抗原性*M. hyopneumoniae*ポリペプチドを包含する。Mhp3と組合せて用いるための適切な抗原性ポリペプチドとしては、P46、P65、P97およびP102タンパク質および/または前記のポリペプチドの断片、変異体および誘導体が挙げられるが、これらに限定されない。ワクチンの非Mhp3ポリペプチド、例えばP46、P65、P97およびP102タンパク質ならびにそれらの断片、変異体および誘導体は、*M. hyopneumoniae*培養から精製されるか、または組換え的に発現され得る。

【0061】このようなワクチンの適切な調製物としてはさらに、液体溶液または懸濁液として注射可能なものが挙げられる。注射前の液体中の溶液に、または懸濁液に適した固体形態も調製され得る。調製物は、乳化もされ得る。活性免疫原成分はしばしば、製薬上許容可能で且つ活性成分と相溶性であるアジュバントと混合される。

【0062】有効アジュバントの例としては以下のものが挙げられるが、これらに限定されない：水酸化アルミニウム、N-アセチルムラミル-L-トレオニル-D-イソグルタミン（thr-MDP）、N-アセチルノルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミン、N-アセチルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミニル-L-アラニン-2-（1'-2'）ジパルミトイール-sn-グリセロ-3-ヒドロキシホスホリオキシ-エチルアミン。

【0063】アジュバントの効能は、Mhp3ポリペプチドエピトープを含有する免疫原性ポリペプチドに対して向けられる抗体の誘導を測定することにより確定され得るが、抗体は、種々のアジュバントから成るワクチン中のこのポリペプチドの投与に起因する。ポリペプチドは、中性または塩形態としてワクチン中に処方され得る。製薬上許容可能な塩としては、酸付加塩（ペプチドの遊離アミノ基を用いて生成される）、ならびに無機酸、例えば塩酸、リン酸、あるいは有機酸、例えば酢酸、シュウ酸、酒石酸、マレイン酸等を用いて生成されるものが挙げられる。遊離カルボキシル基を用いて生成される塩は、無機塩基、例えば水酸化ナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウムまたは鉄、ならびに有機塩基、例えばイソプロピルアミン、トリメチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカイン等からも得られる。

【0064】本発明のワクチン処方物を導入するため

に、多数の方法が用いられ得る。これらの例としては、以下のものが挙げられるが、これらに限定されない：経口、皮内、筋肉内、腹腔内、皮下、鼻腔内経路、ならびに乱切による方法（例えば、二分岐針を用いて皮膚の上層を引っ掻く）。ワクチンが投与される被験者は、好ましくは動物、最も好ましくはブタである。

【0065】本発明のワクチン処方物は、有効免疫感作量のMhp3タンパク質および製薬上許容可能な担体を包含する。ワクチン調製物は、有効免疫感作量の1つ又はそれ以上の抗原および製薬上許容可能な担体を包含する。製薬上許容可能な担体は当業界では周知であって、その例としては以下のものが挙げられるが、これらに限定されない：食塩水、緩衝化食塩水、デキストロース、水、グリセロール、滅菌等張水性緩衝液およびそれらの組合せ。このような許容可能な担体の一例は、1つ又はそれ以上の安定剤、例えば安定化、加水分解化タンパク質、ラクトース等を含有する生理学的平衡化培地である。担体は、好ましくは滅菌性である。処方物は、投与様式に適合すべきである。

【0066】特定の実施態様では、本発明の凍結乾燥Mhp3ポリペプチドが一次容器中に提供される。二次容器は、50%グリセリン、0.25%フェノールおよび防腐剤（例えば、0.005%ブリリアントグリーン）の水性溶液から成る稀釀物を包含する。ワクチン調製物としての精製抗原の使用は、標準方法により実行され得る。例えば、精製タンパク質（単数または複数）は適切な濃度に調整され、あらゆる適切なワクチンアジュバントを用いて処方され、そして使用のために包装されるべきである。適切なアジュバントとしては、以下のものが挙げられるが、これらに限定されない：無機質ゲル、例えば水酸化アルミニウム；界面活性物質、例えばリゾレシチン；グリコシド、例えばサボニン誘導体、例えばクイルA；ブルロニックポリオール；ポリアニオン；非イオン性ブロックポリマー、例えばブルロニックF-127（B.A.S.F., USA）；ペプチド、鉱油、例えばモンタニドISA-50（Seppic, Paris, France）、油乳濁液、例えば鉱油、例えばBayolF/Arlacel Aおよび水の乳濁液、または植物油、水および乳化剤、例えばレシチンの乳濁液；ミョウバン、およびMDP。免疫原は、リポソーム中に混入され得るし、あるいは多糖および/またはワクチン処方物中に用いるためのその他のポリマーと接合され得る。組換え抗原がハプテン、即ちそれがコグネイト抗体と選択的に反応し得る場合に抗原性であるが、しかし免疫応答を引き出し得ない場合には免疫原性でない分子である場合には、ハプテンは担体または免疫原性分子と共有結合し得る。例えば、血清アルブミンのような大型タンパク質は、それと結合するハプテンに免疫原性を付与する。ハプテン-担体は、ワクチンとして用いるために処方され得る。

【0067】有効用量（免疫感作量）の本発明のワクチ

ンは、モデル被験系から得られる用量-反応曲線から推定され得る。本発明は、本発明のワクチン処方物の1つ又はそれ以上の成分を包含する1つ又はそれ以上の容器から成る製剤パックまたはキットも提供する。したがって本発明は、動物を免疫感作し、あるいは動物における種々の疾患または障害を治療または防止する方法であって、有効免疫感作量の本発明のワクチンを動物に投与することを包含する方法を提供する。

【0068】本発明のワクチンにより生成される抗体の使用

10 本発明のMhp3タンパク質を用いた免疫感作により抗原に對して生成される抗体は、診断的イムノアッセイ、受動免疫療法および抗イディオタイプ抗体の生成に潜在的用途を有する。生成された抗体は、当業界で既知の標準技法（例えば、イムノアフィニティークロマトグラフィー、遠心分離、沈降等）により単離され、診断的イムノアッセイに用いられ得る。抗体は、治療および/または診断の進行をモニタリングするためにも用いられ得る。当業界で既知のあらゆるイムノアッセイ系、例えば上記

20 で列挙したものは、この目的のために用いられ得る。それらの例としては、ラジオイムノアッセイ、ELISA（酵素結合イムノソルベント検定）、「サンドイッチ」イムノアッセイ、プレシピチン反応、ゲル拡散プレシピチン反応、免疫拡散検定、凝集検定、補体結合検定、免疫放射定量測定、蛍光イムノアッセイ、タンパク質Aイムノアッセイおよび免疫電気泳動検定を用いた競合的および非競合的検定系が挙げられるが、これらに限定されない。

【0069】本発明のワクチン処方物は、異種生物体に對して向けられる予備生成抗体の投与により宿主の短期防御が成し遂げられる受動免疫療法に用いるための抗体を生成するためにも用いられ得る。免疫感作手法では、用いられる免疫減の量および免疫感作スケジュールは、当業界の医師により確定され、そして被験者の免疫応答および抗体力値を参照して投与される。

【0070】包装

組成物は、所望により、活性成分を含有する1つ又はそれ以上の単位投与形態を含むし得るパックまたは計量分配装置中に存在し得る。パックは、例えば金属またはプラスチック箔、例えばプリスター・パックを含むし得る。

40 パックまたは計量分配装置は、投与のための使用説明書を添付され得る。相溶性製剤担体中に処方される本発明の化合物を包含する組成物も調整され、適切な容器に入れられ、そして指示条件の処置のためにラベルを貼られる。

【0071】〔実施例〕

M. hyopneumoniae染色体DNAの単離

遠心分離（6000gで4°Cで10分間）により細胞を収穫し、リン酸塩緩衝化食塩水中に懸濁し、そして0.1容積の10%硫酸ドデシルナトリウムの付加により溶解するDybvig

50

とAldereteの方法 (Plasmid, 20:33-41; 1988) により、*M. hyopneumoniae*からのゲノムDNAを単離した。トリス-HClで飽和させたフェノール、クロロホルムおよびイソアミルアルコール (25:24:1) の混合物を用いて、溶解物を抽出した。クロロホルムで水性相を抽出し、0.1容積の3 M酢酸ナトリウムと2容積の氷冷エタノールの付加により核酸を沈降させた。-20°Cで1時間のインキュベーション後、微小遠心分離器中での10分間の遠心分離により、核酸を回収した。20 ugのRNアーゼA/mlを含有する水中に拡散を再懸濁し、標本を-20°Cで保存した。

【0072】*M. hyopneumoniae* mhp3の分子クローニング

Mhp3の予め同定された部分アミノ酸配列 (配列番号7~9) (国際特許公告WO96/28472) を基礎にして、変性オリゴヌクレオチドプライマーKWK40、KWK41、KWK42、KWK43、KWK42RCおよびKWK43RC (配列番号10~15) を生かし、合成した (Genosys Biotechnologies, Inc.; The Woodlands, TX)。1 XPCR緩衝液 (Perkin Elmer; Foster City, CA)、2.0 mM MgCl<sub>2</sub>、1 μMの各プライマー、400 μMの各デオキシリトヌクレオチド (Perkin Elmer) を含有する50 μlの反応容量物中のこれらのプライマーの種々の組合せを用いて、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を実行した。増幅のための条件は、94°Cで2分間の変性、その後の25回の変性 (94°Cで1分間)、アニーリング (56°Cで1分間) および重合 (72°Cで1分間) で構成された。プライマーKWK41 (配列番号11) およびKWK42RC (配列番号14) を用いて、長さ約250bpの断片を、410 ngの*M. hyopneumoniae* 232株染色体DNAを用いて増幅した (継代数n=5)。断片を、CR2.1-TOP0 (Invitrogen; Carlsbad, CA) のTAクローニング部位にサブクローニングした。結紮生成物を大腸菌TOP10細胞 (Invitrogen) 中で形質転換した。ジデオキシリトヌクレオチド鎖末端シーケンシング (Advanced Genetic Analysis Center; St. Paul, MN) およびアガロースゲル電気泳動後の制限エンドヌクレアーゼ消化により、クローニングを確認した。

【0073】DNAのコア領域と側接する配列を増幅するためには用いられる方法である逆PCR (Ochman, H., Medhora, M.M., Garza, D., and Hartl, D.L., 1990, In "PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications" Academic Press, San Diego, CA) を用いて、Mhp3をコードする遺伝子の残りの5'および3'末端をクローニングした。以下の制限エンドヌクレアーゼ: AluI, BamHI, EcoRV, EcoRI, HaeIII, HincII, HindII, NdeI, PvuII, Sau3AI, SphI, SspI, XbaIを用いて、未切断DNAを1回消化することにより、*M. hyopneumoniae* 232株 (継代数n=5) 染色体DNA断片のアールを生成した。消化後、結紮により断片を環化し、前記の250 bp断片からの配列を基礎にして設計されたオリゴヌクレオチ

10

20

30

40

50

ドプライマーRAC3 (配列番号16) およびRAC4 (配列番号17) を用いてPCR処理を施した。これらのプライマーによる増幅は、以下のように実行した: 94°Cで2分間変性、その後、40回の変性 (94°Cで1分間)、アニーリング (55°Cで1分間) および重合 (72°Cで2分間)。SspI消化染色体DNAアールは、約600 bpの断片を产生し、これをpCR2.1-TOP0中でサブクローニングした。クローニング断片の配列分析は、遺伝子の5'末端を同定した。mhp3の3'末端に対応するさらに別の配列を得るために、この配列を基礎にしてオリゴヌクレオチドRAC7 (配列番号18) およびRAC8 (配列番号19) を消化した。これらのプライマーを用いた増幅のための条件は、94°Cで9分間の変性、その後の40回の変性 (94°Cで30秒間)、アニーリング (50°Cで30秒間) および重合 (72°Cで1分間) で構成された。SphI消化DNAアールを錠型として用いた場合、多数の生成物 (250 bp~>1 kb) が増幅された。断片の混合物をpCR2.1-TOP0中でクローニングした。クローニングされた最大断片 (~1.2 kb) の配列分析は、さらなる3'配列データを提供した。このデータから、オリゴヌクレオチドRAC12 (配列番号20) およびRAC15 (配列番号23) を消化し、錠型としてHincII-消化DNAアールを用いたPCR増幅のために用いられるよう合成した。パラメーターは、94°Cで9分間の変性、その後の40回の変性 (94°Cで30秒間)、アニーリング (55°Cで30秒間) および重合 (72°Cで2分間) +最終重合工程 (72°Cで7分間) で構成された。長さ約600 bpの断片を増幅し、pCR2.1-TOP0中でクローニングして、シーケンシングした。得られたデータは、Mhp3をコードする遺伝子内の付加的3'配列を提供した。錠型としてHincII-消化DNAアールを用いて、RAC12 (配列番号20) およびRAC15 (配列番号23) に関するさらなるPCR増幅を実行した。増幅のための条件は、94°Cで9分間の変性、その後の35回の変性 (94°Cで1分間)、アニーリング (55°Cで1分間) および重合 (72°Cで3分間) +最終重合工程 (72°Cで7分間) であった。長さ約700 bpの断片を増幅し、pCR2.1-TOP0中でクローニングした。クローニング断片のシーケンシングは新規の3'配列データを生じ、それには、ポリペプチドのカルボキシル末端をコードするものが含まれた。

【0074】前記の予備シーケンシングからの結果を用いて、低継代数 (n=4) *M. hyopneumoniae* 232株染色体DNAから直接、mhp3遺伝子の特異的増幅のためのオリゴヌクレオチドプライマーを設計した。PCR増幅とその後のクローニング工程で生じる可能性のある突然変異による配列人工物の導入を避けるために、試験で直接、これらの生成物をシーケンシングした。

【0075】mhp3遺伝子と側接する合成オリゴヌクレオチドを用いて、染色体DNAからの開放読取り枠 (ORF) を特定的に増幅した。PCR増幅は3通り実行し、50 μlの最終標本用量中に1 μMの各プライマー-Mhp3-U1

(配列番号31) およびMhp3-D (配列番号33)、360 ngの精製染色体DNA、1 xPCR緩衝液 (Ab Peptides, Inc.; St. Louis, MO)、200 μMの各dNTP、7.5U のKlen Taq1 (Ab Peptides, Inc.) および0.15 Uのクロン化Pfu (Stratagene; La Jolla, CA) 热安定性ポリメラーゼを含有した。增幅のための条件は、94°Cで5分間の変性、その後の25回の変性 (94°Cで30秒間)、アニーリング (55°Cで30秒間) および重合 (72°Cで3分、45秒) + 最終重合工程 (72°Cで7分間) で構成された。増幅後、3通りの標本をプールし、回転クロマトグラフィー (QIAquik(商標) PCR精製キット、Qiagen; Santa Clarita, CA) を用いた抽出により、特定の生成物を精製した。次に、ABI自動DNAシーケンサー (Lark Technologies Inc., Houston, TX) 上でのDyeDeoxy末端反応を用いて、プールした混合物に直接配列分析を施した。

【0076】合成オリゴヌクレオチドプライマー (配列番号16~28, 31および33) を用いて、*M. hyopneumoniae* 232株からの増幅生成物の両DNA鎖をシーケンシングした。mhp3遺伝子およびこの領域内でコードされるMhp3タンパク質のヌクレオチド配列は、それぞれ配列番号1および配列番号2中に存在する。mhp3ORFは配列番号1のヌクレオチド97-1452から伸びて、49,775ダルトンという理論的分子量を有する451アミノ酸タンパク質 (配列番号2) をコードする。コード化ポリペプチドは、8つのトリプトファン残基を含有し得る。このうち7つは、多数のマイコプラズマ種におけるこのアミノ酸の付加に関して特定することが知られているTGAコドン (mRNAではUGA) によりコード化される (Dybvig, K., 1990, Ann. Rev. Microbiol. 44:81-104; Yamao, F., Muto, A., Kawauchi, Y., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82:2306-2309)。コード化タンパク質のアミノ末端は、原核生物信号配列に特徴的な特性を有すると思われる (von Heijne, G., 1985, J. Mol. Biol. 184:99-105; Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S. およびvon Heijne, G., 1997, Protein Engineering, 10:1-6) が、しかし切断の正確なサイズは目下分からない。コード化タンパク質 (配列番号2) の位置29のシステイン残基は、スルフヒドリル結合脂肪酸の付加によるプロセッシング後に修飾されて、Mhp3リボタンパク質を作製すると考えられる (Razin, S., Yoge, D., and Naot, Y., 1998, Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62:1094-1156)。

【0077】Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) プログラム (Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410) を用いて、mhp3ORFを既存のヌクレオチドおよびタンパク質データベースと比較した場合、それが最大相同を共有するエンタリーは、*M. arginini* (GenBank寄託番号D16674) からのAg 234-5タンパク質であった。これら2つのポリペプチドをCLUSTAL W (Thompson

n, J.D., Higgins, D.G., and Gibson, T.J., 1994, Nucleic Acids Res., 22:4673-4680) を用いて整列すると、Mhp3およびAg 234-5タンパク質間に36.2%のアミノ酸同一性が認められる (図1)。Ag 234-5をコードする遺伝子は最初は*M. arginini*に存在すると同定された (Ushio, S., Iwaki, K., Taniai, M., Ohta, T., Fukuda, S., Sugimura, K. and Kurimoto, M., 1995, Microbiol. Immunol. 39:395-400) が、近年の証拠は、この遺伝子が実際には*M. hyorhinis*から得られることを明示した (Droeser, M., Wise, K.S., 1998, Abstract E20, 12th International Organisation of Mycoplasmology Conference, Sydney, AU)。それらの研究では、Ag 234-5は、PCR、ザザーンプロットハイブリダイゼーションおよびウエスタンプロット分析により確定した場合、他のマイコプラズマ、例えば*M. hyopneumoniae*の間には保存されないと結論された。

【0078】University of Wisconsin Genetics Computer GroupからのSTEMLOOPプログラム (Devereux, J., Heberli, P., and Smithies, O., 1984, Nuc. Acids Res. 12:387-395) を用いて、mhp3ORFの、特に配列番号1のヌクレオチド1519-1550の下流で配列が同定され、これはおそらくはステムループ構造を形成し得る。ステムは、4つの塩基ループにより分けられる14塩基逆反復により形成され得る。この構造の実在および考え得る機能は、目下不明である。

【0079】付加的ORFは、配列番号5で示されるDNA断片によってもコードされる。このORFは、遺伝子mhp3からの反対鎖上に存在し、配列番号1のヌクレオチド602からヌクレオチド1に延びる。この予測ORFは、22,528ダルトンの理論的分子量を有する、「ORF 1」と呼ばれ、配列番号6で表される少なくとも200アミノ酸のタンパク質をコードする。Mhp3および「ORF 1」は反対鎖上にコードされるが、しかし各コドンの第三塩基 (「ゆらぎ」位置) は、それらの間で共通である。したがって、「ORF 1」中のあらゆる特定のアミノ酸コドンのゆらぎ塩基は、Mhp3遺伝子中の特定のアミノ酸をコードする反対鎖に共有される。2つのタンパク質に関する共有コドン配列のこの独特の整列は、理論では、Mhp3および「ORF 1」に関するコドンゆらぎ位置での遺伝的浮動の衝撃を最小にし、両コード化タンパク質の保存を最大にする。

【0080】プラスミドの調製および寄託物質

アメリカ培養細胞コレクション (ATCC) による保管のために、mhp3遺伝子断片を調製した。前記と同様に特異的5'および3'プライマー-Mhp3-U1 (配列番号31) およびMhp3-D (配列番号33) を用いた3通りのPCR反応からのプール混合物を、回転クロマトグラフィー (QIAquik(商標)) による抽出によって単離し、pCR 2.1-TOPOTACのクローニング部位に挿入した。ベクター特異的シーケンシングプライマーを用いた単一配列延長反

応は、増幅化1,692塩基対断片の終点を確認し、Mhp3をコードする遺伝子がラクトースプロモーターに対して反対配向であることを明示した。このプラスミド構築物はpER427と呼ばれ、大腸菌TOP10細胞(Invitrogen, Carlsbad, CA)に導入された。その結果生じた菌株をPz427と名付けた。

【0081】mhp3遺伝子の部位特異的突然変異誘発

大腸菌内での発現のためのMhp3をコードするDNAの調製は、推定リーダーをコードする配列および脂肪酸付着部位、システイン29の除去ならびにTGGコドンへの6つのTGAコドンの変換によるM. hyopneumoniae mhp3遺伝子の修飾を要する。シグナルペプチドをコードする配列を欠く遺伝子の増幅のために用いられるオリゴヌクレオチドプライマーを、RAC23(配列番号29)およびRAC24(配列番号30)と名付けた。M. hyopneumoniae 2株(総代数n=5)染色体DNAからの断片の増幅のための条件は、94°Cで9分間の変性、その後の25サイクルの、変性(94°Cで1分間)、アニーリング(50°Cで1分間)、および重合(72°Cで2分間)、プラス最終重合工程(72°Cで7分間)であった。増幅断片をpCR2.1-TOPO中にクローニングした。クローニングの確認は、シーケンシングおよび制限エンドヌクレアーゼ消化、その後のゲル電気泳動によった。上記クローニング断片の5'末端の配列は、開始メチオニン残基をコードし、次に、上記コードされたポリペプチドの位置29のシステイン残基の後のアミノ酸であるトリプトファン残基をコードする(配列番号2参照)。その3'末端においては、野生型ヌクレオチド配列(配列番号1)内に塩基変化が導入され、これはクローニング目的のための制限部位を作り出した。これは、野生型ポリペプチドのカルボキシ末端の2アミノ酸配列Asn-Leu(配列番号4)により置換されたLys-Asn(配列番号2)をもたらした。追加のヌクレオチドが、野生型遺伝子に比べてRAC24プライマー(配列番号30)内に存在したが、上記PCR産物中には存在しなかった。オリゴヌクレオチドRAC23(配列番号29)とRAC24(配列番号30)はそれらの5'末端付近にそれぞれ合成制限部位NdeIおよびXbaIを含入して、さまざまなプラスミドへの上記遺伝子のクローニングを促した。それぞれの制限酵素による切断を促すために、追加のヌクレオチド(RAC23(配列番号29)に関しては6; RAC24(配列番号30)に関しては7)をも、各プライマーの5'末端に付加した。

【0082】一旦、シグナルペプチドをコードする配列が除去されると、6つの内部TGAコドンが遺伝子内に残った。大腸菌内での全長ポリペプチドの発現を可能にするために、オリゴヌクレオチド推定in vitro突然変異誘発により、これらをTGGコドンに変換した。プラスミドpCR2.1-TOPO:mhp3を大腸菌CJ236株(dut-ung)内に形質転換した。上記プラスミドを含む細胞へのヘルバーファージR408の添加は、ウラシル含有一本鎖(ss)

10

20

30

40

DNAを有するファージ粒子の産生をもたらした。これらの粒子を単離し、そして抽出および沈降によりssDNAを精製した。鏡型としての上記DNA、オリゴヌクレオチドMhp3-2M、Mhp3-3M、Mhp3-4M、Mhp3-5M、Mhp3-6M、Mhp3-7M(配列番号35~40)、ならびにMutagenic System(BioRad Laboratories; Hercules, CA)からの試薬を用いて、突然変異誘発を実行した。上記ssDNA、オリゴヌクレオチドおよびアニーリング緩衝液を混合し、そして70°Cに加熱した後、1時間かけて30°Cまで冷却した。T4DNAリガーゼ、T7DNAポリメラーゼおよび合成緩衝液を添加することにより、上記相補鎖の合成を実施した。上記混合物を氷上で5分間、次に室温で5分間、その後37°Cで30分間インキュベートした。その結果生じた二本鎖DNA分子をDH5α UltraComp細胞(Gibco BRL; Gaithersburg, MD)内に形質転換させた。クローニングを増殖させ、そしてシーケンシングにより所望の突然変異に関してスクリーニングした。このやり方で、全突然変異(TGA>TGG)を確認した。さらに、不注意に、A>Gトランジションが起き、これは、オリゴヌクレオチドMhp3-2M(配列番号35)の配列による、野生型遺伝子(配列番号1)のヌクレオチド388に対応する。これは、野生型Mhp3(配列番号2)のアミノ酸残基98でのセリン(AGT)から、組換え体Mhp3(配列番号4)のアミノ酸残基70でのグリシン(GGT)への変更をもたらした。

【0083】上記の変更から生じた組換え体mhp3遺伝子(上記の不注意によるA>Gトランジションを含むかまたは含まない)を、配列番号3に示し、そして(アミノ酸残基70にグリシンを含む)上記組換えmhp3遺伝子によりコードされるオープン・リーディング・フレームを配列番号4に示す。

発現ベクターおよび発現宿主株中の組換えmhp3遺伝子のクローニング

組換えタンパク質発現のために、シグナルペプチドをコードする配列を欠く突然変異化mhp3遺伝子(配列番号3)をpBAD/Thio-TOPO発現プラスミド(Invitrogen)中でクローニングした。この構築物を直接、発現宿主大腸菌BL21中で形質転換させた。適切なプラスミドを含有するクローニングが同定された。

【0084】組換えMhp3タンパク質の発現

チオレドキシン-Mhp3融合を発現する大腸菌BL21形質転換体の凍結作業溶液を解氷させて、以下のものを含有するBL21/D<sub>vi</sub>限定培地中に1:5000稀釀で植え付けた: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(6g/l)、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(3g/l)、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>(5g/l)、NaCl(2g/l)、0.2mM CaCl<sub>2</sub>(15g/l)、0.4mM FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O(5g/l)、0.4mM MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O(480g/l)、ZnCl<sub>2</sub>(6.5g/l)、MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O(12g/l)、Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O(5g/l)、CuSO<sub>4</sub>(1.5g/l)、CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O(2g/l)、H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>(0.5g/l)および37%HC

1 (5 ml/l)。カルペニシリソも付加して、濃度を125  $\mu\text{g/ml}$ とした。A<sub>625</sub>が10~20になるまで、5リットル作業容積BioFlow 3000発酵器 (New Brunswick Scientific; Edison, NJ) 中で、37°Cで供給一バッチ条件 (50% デキストロース) 下で培養を増殖させた。

【0085】5リットル発酵物からの粗換えチオレドキシン-Mhp3を発現する大腸菌BL21形質転換体の温潤細胞を遠心分離により収穫し、リン酸塩緩衝化食塩水中に再懸濁した。細胞を機械的に溶解した。遠心分離後、ペレットを捨てた。上清をイオン交換カラムに通して、NaCl勾配を用いて溶出した。上記融合タンパク質を含有する画分を、アルコールし、透析してNaClを除去し、そして0.2  $\mu\text{m}$  フィルターを用いてフィルター滅菌した。この調製物を、ワクチン接種試験のために使用する。

#### 【0086】粗換えMhp3の免疫学的特徴付け

先に記載したように調製した粗換えチオレドキシン-Mhp3のタンパク質濃度を、BCA Protein Assay キット (Pierce) を使用して測定した。簡単に言えば、各サンプルを、滅菌、脱イオン、蒸留水 (dd H<sub>2</sub>O) 中、1/10, 1/20, 1/40、と1/80に希釈した。BSA(タンパク質標準)を、200~800  $\mu\text{g/ml}$  の範囲にわたる濃度に希釈した。20  $\mu\text{l}$  容量のサンプル又は標準を、96ウェル・マイクロタイヤー・プレート内に3連で添加し、そして試薬A中に1/50に希釈した試薬B200  $\mu\text{l}$  を、各ウェルに添加した。上記プレートを30分間37°Cでインキュベートした。サンプルの吸光度を560nmで測定した。各サンプルについてのタンパク質濃度をBSA標準曲線を使用して外挿により計算した。

【0087】粗換えMhp3のアリコート (タンパク質負荷は可変であった) と、*M. hyopneumoniae*、*Mycoplasma hyorhinis*、及び*Mycoplasma mycoides* 亜種*mycoides*の全バクテリア細胞溶解産物を、10  $\mu\text{l}$  の最終容量まで再懸濁させ、そして10  $\mu\text{l}$  の2倍還元サンプル・バッファー (Owl Scientific) を添加した。サンプルを 100°Cで10分間加熱し、そして全容量を、100ウェル、1.5mm厚、10% Tris-グリシン・ゲル (Novex) の別個のウェルにロードした。染色されない、広いレンジの分子量マーカー (Novex) も含まれた。

【0088】SDS-PAGEにより分離されたタンパク質を、1時間、100mAの一定電流でPVDF膜 (Owl Scientific) に移した。このプロットを、緩やかに攪拌しながら、室温で1時間、TBS(TBST) 中5%スキム・ミルク粉末及び0.5%Tween 20から成るブロッキング・バッファー中にインキュベートした。このブロッキング・バッファーを除去し、そして上記膜をTBSTで5分間1回洗浄した。1次抗体を、*M. hyopneumoniae*株232を用いた実験的接種の後にブタから得た。希釈血清を上記膜に添加し、その後室温で1時間インキュベートした。アルカリ・ホスファターゼ・コンジュゲート・プロテインG抗体 (Pierce) を希釈し、上記の洗浄された膜に添加し、そして室

10

20

30

40

50

温で1時間インキュベートした。この膜を、TBSTで洗浄し、そして基質BCIP/NBT (Kirkegaard and Perry Laboratories) を上記膜に添加し、そして好適な色反応が顕色されるまでインキュベートした。次に、この膜を水で灌いで、上記反応を停止させ、そして室温で乾燥させた。

【0089】*M. hyopneumoniae*で実験的に接種されたブタからの血清は、60kDa のバンドが同定されたとき、精製された粗換え発現Mhp3を認識しなかった (図2)。これは、粗換えタンパク質が、全細胞*M. hyopneumoniae*生物にブタを晒すことに対する応答において生成された抗体により認識されたエピトープを発現したということを示唆する。

#### 【0090】ワクチン候補としての粗換えMhp3の効力をテストするための動物試験

*M. hyopneumoniae*により引き起こされる病気又は*M. hyopneumoniae*に対する先のワクチン接種の履歴をもたない健康な雑種ブタ (生後約12~16日) を得た。動物を、担架 (litter) により群にランダムに割り当てた。ブタを、試験の開始前最短で5日間、放置して順応させた。動物を “0” 日目の筋中経路 (IM; 左の首の筋肉) により適当な実験ワクチン1  $\mu\text{l}$  でワクチン接種した。このとき、ブタは生後約19~23日であった。最初のワクチン接種後約2~3週間目に、ブタは、上記の適当な実験ワクチンの第2の1  $\text{ml}$  投与量 (IM; 右の首の筋肉) を受容する。全てのブタを、接種後の兆候、例えば、嘔吐、抑うつ、下痢、運動失調-筋肉協調運動失調、呼吸の増加、又は震えについて (1時間まで又は保証される場合)、詳しく観察する。

【0091】第2のワクチン接種後約2~4週間目に、約  $5.0 \times 10^8$  の変色単位/ $\text{ml}$  (ccu/ml) を含む*M. hyopneumoniae*株の生有毒肺ホモジネート・カルチャーワークス/鼻孔を鼻孔内接種した。全ての接種された動物は、接種後約4週間に検死解剖した。肺を摘出し、そして*M. hyopneumoniae*感染に帰される特徴的な病変について徹底的に評価した。個々の肺病変等級は、画像分析により決定されるであろう。肺組織のバイアス・サンプルを、バクテリアの単離 (ccu/gの組織)、組織病理学、及びIFAのために、各接種動物から得ることができる。

#### 【0092】微生物の寄託

以下の微生物株を、American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, VAに、1999年9月9日に寄託し、そして以下の受託番号が割り当てられている:

微生物	受託番号
Pz427	PTA-634

本発明は、本明細書中に記載した特定の態様により範囲が限定されてはならない。実際、本明細書に記載したものに加えて本発明のさまざまな修正・変更は、以上の説明及び添付図面から当業者に明らかになるであろう。こ

ののような修正・変更は、添付の請求の範囲内にあること

が意図される。

\*示を、全体としてここに本明細書に援用する。

【0093】特許出願、特許、及び刊行物を含むさまざ

【0094】

まな引用文献が本明細書中に引用されるか、これらの開\*

【配列表】

<110> Pfizer Products Inc.  
 <120> NUCLEIC ACIDS AND PROTEINS OF THE MYCOPLASMA PNEUMONIAE  
 mhp3 GENE AND USES THEREOF  
 <130> B015655  
 <141> 2001-03-30  
 <160> 41  
 <170> PatentIn Ver. 2.1  
 <210> 1  
 <211> 1692  
 <212> DNA  
 <213> *Mycoplasma hyopneumoniae*  
 <400> 1  
 gtttttgaat ataataaaaa atgtaaaata aaaattaatt tattaaaaaa taattgaaag 60  
 tcatcgtaat taaaacaatt aattaggaga acaactatga aaaaaaagat aaaatgaaat 120  
 aaatttcttgc ttttaggctt agttttccg ctttcagcaa tcgcgacaat ctctgcccga 180  
 tggggata aagaacaac taaagaagaa aaatcagccg ataataaaaa taagcaaatac 240  
 actgatgtct caaaaatttc aggactagt aatgaacgaa aatccgaaat tatggccgca 300  
 aaagctgtat caaacaaca ttttggcta aatatggca ttgtaaaccgc tggggaaacg 360  
 gtaaatgata attcatttaa ccaatcaagt tgagaggca ttcaacaact tggcgcttt 420  
 actggaggtg agattacttc agtagatagt tcaactgtc aacttgaagg aaaaatatacg 480  
 tcacttgcata ataccaacaa aaatgttga gtactttctg gtttcaaca cgtgtatgcg 540  
 ttcaacaat gattaaaaat ccctgaaaat aagcaattat ttactgaaaa aataattatc 600  
 atactcgaa ttgactgaac tgatactgaa aatgtatcc caacaggtcg atatattaaat 660  
 ttaacctata aaactgaaga agccggatga ctgcaggat atgcgaatgc ttcccttttg 720  
 gaaaaaaaaat tcccaagtga tccaaactaa agatcagcaa ttgttatcg tggggatt 780  
 tcgcagctg taactgattt ttcgtgtt tatctagccg gaattaaagc ttgaaatcta 840  
 aaaaattctg ataaaaaaaaac aaagataaca actgataaaa tcgagataaa tcttgggtt 900  
 gatgttcaag atacttcaac aaaagaaaga cttgaacaaa ttgtttcaaa agataaaacct 960  
 tcaacactat tagctgtcgc tggaccactt actgaaattt ttcgttat ttcgttat 1020  
 caaaatgatc ttatctcat ttgtgttgc accgaccaat cacttggta tacaactt 1080  
 aaaaataaaat ttccacctc aattttgaaa aatttagtt actccgtttt cagcgttctt 1140  
 agtgatttat ataccaaaaa atcaattca agaaatttag ccgttttgc atttggtaaa 1200  
 aaaagtgcac ccgttatct tggattaaa gacaggtttgc tgatattgc tgatattct 1260  
 ttggca atgataaaaa actgcacact gaaggcattt ctgaaatctaa aaaaatattt 1320  
 gaagaaaaaa ctaagacaaat ttccgttgcga gaaggctgtt aactttaga aattccggaa 1380  
 atgcctata aacaacctga taagcaacag gaaagcttag acaaaactaat taccgtat 1440  
 aataaaaaatt aagtaaaaaa aaataacaat tttaaatacat tatactttt tttagagatt 1500  
 aattttcttc taatttagtt taatttaata taaaattata taaaattaaa aaaaataaaaa 1560  
 atccggacta tttttgttcc ggattttta tttttgttt actatttaat ataatgataa 1620  
 atcaggattat tgcatttgc ttatccat ttcgtaaaaa atttggcagt ttatgcac 1680  
 attacaaaaat ag 1692  
 <210> 2  
 <211> 451  
 <212> PRT  
 <213> *Mycoplasma hyopneumoniae*  
 <400> 2

Met Lys Lys Lys Ile Lys Trp Asn Lys Phe Leu Gly Leu Gly Leu Val

35

1	5	10	15
Phe Pro Leu Ser Ala Ile Ala Thr Ile Ser Ala Gly Cys Trp Asp Lys			
20	25	30	
Glu Thr Thr Lys Glu Glu Lys Ser Ala Asp Asn Gln Asn Lys Gln Ile			
35	40	45	
Thr Asp Val Ser Lys Ile Ser Gly Leu Val Asn Glu Arg Lys Ser Glu			
50	55	60	
Ile Met Ala Ala Lys Ala Asp Ala Asn Lys His Phe Gly Leu Asn Met			
65	70	75	80
Ala Ile Val Thr Ala Gly Gly Thr Val Asn Asp Asn Ser Phe Asn Gln			
85	90	95	
Ser Ser Trp Glu Ala Ile Gln Gln Leu Gly Ala Leu Thr Gly Glu			
100	105	110	
Ile Thr Ser Val Asp Ser Ser Thr Ala Glu Leu Glu Gly Lys Tyr Ser			
115	120	125	
Ser Leu Ala Asn Thr Asn Lys Asn Val Trp Val Leu Ser Gly Phe Gln			
130	135	140	
His Gly Asp Ala Phe Thr Arg Trp Leu Lys Ile Pro Glu Asn Lys Gln			
145	150	155	160
Leu Phe Thr Glu Lys Asn Ile Ile Ile Leu Gly Ile Asp Trp Thr Asp			
165	170	175	
Thr Glu Asn Val Ile Pro Thr Gly Arg Tyr Ile Asn Leu Thr Tyr Lys			
180	185	190	
Thr Glu Glu Ala Gly Trp Leu Ala Gly Tyr Ala Asn Ala Ser Phe Leu			
195	200	205	
Ala Lys Lys Phe Pro Ser Asp Pro Thr Lys Arg Ser Ala Ile Val Ile			
210	215	220	
Gly Gly Gly Ile Ser Pro Ala Val Thr Asp Phe Ile Ala Gly Tyr Leu			
225	230	235	240
Ala Gly Ile Lys Ala Trp Asn Leu Lys Asn Ser Asp Lys Lys Thr Lys			
245	250	255	
Ile Thr Thr Asp Lys Ile Glu Ile Asn Leu Gly Phe Asp Val Gln Asp			
260	265	270	
Thr Ser Thr Lys Glu Arg Leu Glu Gln Ile Ala Ser Lys Asp Lys Pro			
275	280	285	
Ser Thr Leu Leu Ala Val Ala Gly Pro Leu Thr Glu Ile Phe Ser Asp			
290	295	300	
Ile Ile Ala Asn Gln Asn Asp Arg Tyr Leu Ile Gly Val Asp Thr Asp			
305	310	315	320
Gln Ser Leu Val Tyr Thr Lys Thr Lys Asn Lys Phe Phe Thr Ser Ile			
325	330	335	
Leu Lys Asn Leu Gly Tyr Ser Val Phe Ser Val Leu Ser Asp Leu Tyr			
340	345	350	
Thr Lys Lys Ser Asn Ser Arg Asn Leu Ala Gly Phe Glu Phe Gly Lys			
355	360	365	
Lys Ser Ala Thr Val Tyr Leu Gly Ile Lys Asp Arg Phe Val Asp Ile			
370	375	380	
Ala Asp Thr Ser Leu Glu Gly Asn Asp Lys Lys Leu Ala Thr Glu Ala			
385	390	395	400
Ile Ser Glu Ala Lys Lys Glu Phe Glu Glu Lys Thr Lys Thr Ile Pro			

37

405 410 415

Ala Glu Glu Val Arg Lys Thr Leu Glu Ile Pro Glu Met Pro Asp Lys

420 425 430

Gln Pro Asp Lys Gln Gln Glu Ser Leu Asp Lys Leu Ile Thr Asp Ile

435 440 445

Asn Lys Asn

450

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 1263

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: mhp3

manipulated for in vitro expression

&lt;400&gt; 3

atgtggata aagaacaac taaagaagaa aatcagccg ataatcaaaa taagcaaatc 60  
 actgatgtct caaaaatttc aggactagt taatgaacgaa aatccgaaat tatggccgca 120  
 aaagctgtatc caaacaaca ttttggctaa aatatggcaa ttgttaaccgc ttgtggaaacg 180  
 gtaaatgata attcattttaa ccaatcargt tggaggca ttcaacaact tggcgcttt 240  
 actggagggtg agattacttc agtagatgt tcaactgtcg aacttgaagg aaaaatatacg 300  
 tcacttgctaa ataccaacaa aatgtttgg gtacttctg gtttcaaca cggtgatgcg 360  
 ttcacaagat ggttaaaaat ccctgaaaat aagcaattat ttactgaaaa aatattatc 420  
 atactcgaa ttgactggac tgactactaa aatgtaaatc caacagggtcg atatattat 480  
 ttaacctata aaactgaaga agccggatgg ctgtcaggat atgeaatgc ttcccttttg 540  
 gcaaaaaaat tcccaagtga tccaaactaaa agatcagcaa ttgttatcg tggattggatt 600  
 tcgcccgtg taactgattt ttcgtcggt tatctagccg gaattaaagc ttggaatcta 660  
 aaaaattctg ataaaaaaac aaagataaca actgataaaa tcgagataaa tcttgggttt 720  
 gatgttcaag atacttcaac aaaagaaaaga ctgtacaaa ttgttcaaaa agataaaacct 780  
 tcaacactat tagctgtcgc tggaccactt actgaaattt ttcggatataatcgaaac 840  
 caaaaatgtc gttatctcat tgggttgc accgaccaat cactgttta taaaaaaact 900  
 aaaaataaat ttttccctc aattttgaaa aattttagtt actccgtttt cagcgtttt 960  
 agtgatttat ataccaaaaa atcaattca agaaaatttg ccgttttga atttggtaaa 1020  
 aaaagtgcac ccgtttatct tggattaaa gacagtttg tcgtatattc tgatacttct 1080  
 ttagaaggca atgataaaaa actcgcaact gaagccattt ctgaagctaa aaaagaattt 1140  
 gaagaaaaaa ctaagacaat tccgtccgaa gaaggctgtaa aactttttaga aattccggaa 1200  
 atgcctgata aacaacctga taagcaacag gaaagcttag acaaacttaa ttaccgatat 1260  
 taa 1263

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 423

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: mhp3

manipulated for in vitro expression

&lt;400&gt; 4

Met Trp Asp Lys Glu Thr Thr Lys Glu Glu Lys Ser Ala Asp Asn Gln

1 5 10 15

Asn Lys Gln Ile Thr Asp Val Ser Lys Ile Ser Gly Leu Val Asn Gln

20 25 30

Arg Lys Ser Glu Ile Met Ala Ala Lys Ala Asp Ala Asn Lys His Phe

39

35

40

45

Gly Leu Asn Met Ala Ile Val Thr Ala Gly Gly Thr Val Asn Asp Asn  
 50 55 60  
 Ser Phe Asn Gln Ser Gly Trp Glu Ala Ile Gln Gln Leu Gly Ala Leu  
 65 70 75 80  
 Thr Gly Gly Glu Ile Thr Ser Val Asp Ser Ser Thr Ala Glu Leu Glu  
 85 90 95  
 Gly Lys Tyr Ser Ser Leu Ala Asn Thr Asn Lys Asn Val Trp Val Leu  
 100 105 110  
 Ser Gly Phe Gln His Gly Asp Ala Phe Thr Arg Trp Leu Lys Ile Pro  
 115 120 125  
 Glu Asn Lys Gln Leu Phe Thr Glu Lys Asn Ile Ile Leu Gly Ile  
 130 135 140  
 Asp Trp Thr Asp Thr Glu Asn Val Ile Pro Thr Gly Arg Tyr Ile Asn  
 145 150 155 160  
 Leu Thr Tyr Lys Thr Glu Glu Ala Gly Trp Leu Ala Gly Tyr Ala Asn  
 165 170 175  
 Ala Ser Phe Leu Ala Lys Phe Pro Ser Asp Pro Thr Lys Arg Ser  
 180 185 190  
 Ala Ile Val Ile Gly Gly Ile Ser Pro Ala Val Thr Asp Phe Ile  
 195 200 205  
 Ala Gly Tyr Leu Ala Gly Ile Lys Ala Trp Asn Leu Lys Asn Ser Asp  
 210 215 220  
 Lys Lys Thr Lys Ile Thr Thr Asp Lys Ile Glu Ile Asn Leu Gly Phe  
 225 230 235 240  
 Asp Val Gln Asp Thr Ser Thr Lys Glu Arg Leu Glu Gln Ile Ala Ser  
 245 250 255  
 Lys Asp Lys Pro Ser Thr Leu Leu Ala Val Ala Gly Pro Leu Thr Glu  
 260 265 270  
 Ile Phe Ser Asp Ile Ile Ala Asn Gln Asn Asp Arg Tyr Leu Ile Gly  
 275 280 285  
 Val Asp Thr Asp Gln Ser Leu Val Tyr Thr Lys Thr Lys Asn Lys Phe  
 290 295 300  
 Phe Thr Ser Ile Leu Lys Asn Leu Gly Tyr Ser Val Phe Ser Val Leu  
 305 310 315 320  
 Ser Asp Leu Tyr Thr Lys Ser Asn Ser Arg Asn Leu Ala Gly Phe  
 325 330 335  
 Glu Phe Gly Lys Ser Ala Thr Val Tyr Leu Gly Ile Lys Asp Arg  
 340 345 350  
 Phe Val Asp Ile Ala Asp Thr Ser Leu Glu Gly Asn Asp Lys Lys Leu  
 355 360 365  
 Ala Thr Glu Ala Ile Ser Glu Ala Lys Lys Glu Phe Glu Glu Lys Thr  
 370 375 380  
 Lys Thr Ile Pro Ala Glu Glu Val Arg Lys Thr Leu Glu Ile Pro Glu  
 385 390 395 400  
 Met Pro Asp Lys Gln Pro Asp Lys Gln Gln Glu Ser Leu Asp Lys Leu  
 405 410 415  
 Ile Thr Asp Ile Asn Asn Leu  
 420  
 <210> 5

41

&lt;211&gt; 602

&lt;212&gt; DNA

<213> *Mycoplasma hyopneumoniae*

&lt;400&gt; 5

atgataatat tttttcagt aaataattgc ttattttcag ggattttaa tcatcttg 60  
 aacgcacac cgtgttggaa accagaaaatc actcaaactt ttttgggtt attagcaagt 120  
 gagctatatt ttccctcaag ttccggcgtt gaactatcta ctgaagtaat ctcacccca 180  
 gtaagagcgc caagttttt aattgcctct caacttgcattt ggttaaatga attatcattt 240  
 accgttccac cagcgggtac aattgccata tttagccaa aatgtttgtt tgcattcagct 300  
 tttgcgcaca taatttcggaa ttttcgttca ttaactatgc ctgaatttt tgagacatca 360  
 gtgatttgc tattttgatt atccgcgtat ttttcttctt tagttgttc ttatccaa 420  
 catccggcag agattgtcgc gattgtcga agcggaaaaa ctaagcctaa gccaagaaat 480  
 ttatttcatt ttatctttt tttcatagtt gttctctaa ttaattgtt taattacgat 540  
 gactttcaat tatttttaa taaatttaatt tttatccat attttctatt atattcaaaa 600  
 ac 602

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 200

&lt;212&gt; PRT

<213> *Mycoplasma hyopneumoniae*

&lt;400&gt; 6

Met Ile Ile Phe Phe Ser Val Asn Asn Cys Leu Phe Ser Gly Ile Phe

1 5 10 15

Asn His Leu Val Asn Ala Ser Pro Cys Trp Lys Pro Glu Ser Thr Gln

20 25 30

Thr Phe Leu Leu Val Leu Ala Ser Glu Leu Tyr Phe Pro Ser Ser Ser

35 40 45

Ala Val Glu Leu Ser Thr Glu Val Ile Ser Pro Pro Val Arg Ala Pro

50 55 60

Ser Cys Trp Ile Ala Ser Gln Leu Asp Trp Leu Asn Glu Leu Ser Phe

65 70 75 80

Thr Val Pro Pro Ala Val Thr Ile Ala Ile Phe Ser Pro Lys Cys Leu

85 90 95

Phe Ala Ser Ala Phe Ala Ala Ile Ile Ser Asp Phe Arg Ser Leu Thr

100 105 110

Ser Pro Glu Ile Phe Glu Thr Ser Val Ile Cys Leu Phe Trp Leu Ser

115 120 125

Ala Asp Phe Ser Ser Leu Val Val Ser Leu Ser Gln His Pro Ala Glu

130 135 140

Ile Val Ala Ile Ala Glu Ser Gly Lys Thr Lys Pro Lys Pro Arg Asn

145 150 155 160

Leu Phe His Phe Ile Phe Phe Ile Val Val Leu Leu Ile Asn Cys

165 170 175

Phe Asn Tyr Asp Asp Phe Gln Leu Phe Phe Asn Lys Leu Ile Phe Ile

180 185 190

Leu His Phe Leu Leu Tyr Ser Lys

195 200

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 14

&lt;212&gt; PRT

<213> *Mycoplasma hyopneumoniae*

43

&lt;400&gt; 7

Ala Gly Xaa Trp Ala Lys Glu Thr Thr Lys Glu Glu Lys Ser

1 5 10

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:

Oligonucleotide

&lt;400&gt; 8

Ala Trp Val Thr Ala Asp Gly Thr Val Asn

1 5 10

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:

Oligonucleotide

&lt;400&gt; 9

Ala Ile Val Thr Ala Asp Gly Thr Val Asn Asp Asn Lys Pro Asn Gln

1 5 10 15

Trp Val Arg Lys Tyr

20

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:

Oligonucleotide

&lt;400&gt; 10

tgytgrgcna argaracnac naargargar

30

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:

Oligonucleotide

&lt;400&gt; 11

tgttgagcwa aagaacwac waaagaagaa

30

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:

Oligonucleotide

45  
<400> 12  
tgrgtacng cngayggnc ngttaay 27  
<210> 13  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:  
Oligonucleotide  
<400> 13  
tgagtwacwg cwgtatggwac wgttaat 27  
<210> 14  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:  
Oligonucleotide  
<400> 14  
rttnacngtn ccrtengcng tnacyc 26  
<210> 15  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:  
Oligonucleotide  
<400> 15  
atssacgts ccatcsgcsg tsactc 26  
<210> 16  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:  
Oligonucleotide  
<400> 16  
tttgagacat cagtgatttg c 21  
<210> 17  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:  
Oligonucleotide  
<400> 17  
gaacgaaaat ccgaaattat gg 22  
<210> 18  
<211> 22  
<212> DNA

47

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:

Oligonucleotide

&lt;400&gt; 18

ctatctactg aagaatctca cc

22

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:

Oligonucleotide

&lt;400&gt; 19

gtgatgccgt tcacaagatg

20

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:

Oligonucleotide

&lt;400&gt; 20

cactaagaac gctgaaaacg g

21

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:

Oligonucleotide

&lt;400&gt; 21

gattacaact gtaaaatcga g

21

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:

Oligonucleotide

&lt;400&gt; 22

ggcttttcca gttttatagg

20

&lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:

Oligonucleotide

&lt;400&gt; 23

49

aaactcgcaa ctgaagcc 18  
<210> 24  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:  
    Oligonucleotide  
<400> 24  
gaaatgcctg ataaacaacc 20  
<210> 25  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:  
    Oligonucleotide  
<400> 25  
cttcagaaaat ggcttcagtt gc 22  
<210> 26  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:  
    Oligonucleotide  
<400> 26  
gctagataac cagcgataaa atcag 25  
<210> 27  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:  
    Oligonucleotide  
<400> 27  
tgcataatcc tgattttatc 19  
<210> 28  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:  
    Oligonucleotide  
<400> 28  
tcaaaggcat cgtaattaaa ac 22  
<210> 29  
<211> 34  
<212> DNA

51

<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:  
    Oligonucleotide  
<400> 29  
aatcggcata tgtggataa agaaacaact aaag 34  
<210> 30  
<211> 34  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:  
    Oligonucleotide  
<400> 30  
ggagtaatct agattattaa tatcgtaat taag 34  
<210> 31  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:  
    Oligonucleotide  
<400> 31  
gtttttgaat ataatagaaa atg 23  
<210> 32  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:  
    Oligonucleotide  
<400> 32  
tttattaaaa aataattgaa agtcatacg 28  
<210> 33  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:  
    Oligonucleotide  
<400> 33  
ctattttata attggcataa aaactgaa 28  
<210> 34  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:  
    Oligonucleotide  
<400> 34

53

gataaaatgg aataaatttc ttgg

24

&lt;210&gt; 35

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:

Oligonucleotide

&lt;400&gt; 35

caggttggga ggcaattcaa c

21

&lt;210&gt; 36

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:

Oligonucleotide

&lt;400&gt; 36

caaaaatgtt tgggtacttt ctgg

24

&lt;210&gt; 37

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:

Oligonucleotide

&lt;400&gt; 37

cacaagatgg ttaaaaatcc c

21

&lt;210&gt; 38

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:

Oligonucleotide

&lt;400&gt; 38

ggaattgact ggactgatac tg

22

&lt;210&gt; 39

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:

Oligonucleotide

&lt;400&gt; 39

gccggatggc ttgcaggata tg

22

&lt;210&gt; 40

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

55

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:

Oligonucleotide

&lt;400&gt; 40

taaagcttgg aatctaaaaa attc

24

&lt;210&gt; 41

&lt;211&gt; 457

&lt;212&gt; PRT

<213> *Mycoplasma hyorhinis*

&lt;400&gt; 41

Met Asn Phe Lys Lys Ser Leu Leu Phe Leu Thr Gly Thr Ile Ser Thr  
 1 5 10 15  
 Val Ala Ser Val Ala Thr Phe Val Ser Cys Gly Glu Thr Asp Lys Glu  
 20 25 30  
 Gly Lys Ile Ile Arg Ile Phe Asp Asn Ser Phe Val Lys Asp Arg Gln  
 35 40 45  
 Ala Glu Ile Glu Lys Ala Lys Asn Phe Asp Phe Asn Thr Val Leu Leu  
 50 55 60  
 Thr Ala Gly Gly Thr Val Gln Asp Lys Ser Phe Asn Gln Ser Ile Trp  
 65 70 75 80  
 Glu Ala Val Leu Glu His Tyr Asp Gln Ile Glu Lys Thr Thr Asn Leu  
 85 90 95  
 Asp Arg Val Ser Gln Glu Thr Asn Asn Gln Ser Glu Leu Ile Gly Lys  
 100 105 110  
 Tyr Lys Asn Phe Leu Asn Gly Asn Lys Asn Val Trp Ile Leu Thr Gly  
 115 120 125  
 Phe Gln Gln Gly Gln Glu Phe Pro Lys Phe Leu Lys Gln Thr Asp Ser  
 130 135 140  
 Asn Gly Lys Lys Tyr Ser Asp Leu Leu Ala Glu Lys Lys Val Ile Ile  
 145 150 155 160  
 Val Ala Val Asp Trp Asp Leu Ser Lys Glu Asp Lys Asp Leu Ile Lys  
 165 170 175  
 Ala Gly His Phe Ile Ser Leu Leu Tyr Lys Thr Glu Glu Ala Gly Phe  
 180 185 190  
 Ile Ala Gly Tyr Ala Ser Ser Lys Phe Leu Ala Tyr Lys Phe Pro Asn  
 195 200 205  
 Asp Glu Ala Lys Arg Thr Ile Ala Pro Phe Gly Gly His Gly Ala  
 210 215 220  
 Gly Val Thr Asp Phe Ile Ala Gly Phe Leu Ala Gly Ile Ala Lys Tyr  
 225 230 235 240  
 Asn Asn Asp Asn Pro Thr Ala Lys Val Thr Ile Ser Asp Asn Asn Ile  
 245 250 255  
 Asn Ile Asp Thr Gly Phe Ile Ser Asn Asp Lys Thr Ala Thr Phe Ile  
 260 265 270  
 Asn Gly Ile Val Asn Lys Ser Ser Leu Val Leu Pro Val Ala Gly Ser  
 275 280 285  
 Leu Thr Ser Ser Val Val Asp Ala Ile Lys Lys Ser Asn Lys Asp Thr  
 290 295 300  
 Lys Tyr Leu Ile Gly Val Asp Thr Asp Gln Ser Lys Ile Phe Ser Pro  
 305 310 315 320

Ala Thr Val Phe Thr Ser Ile Glu Lys His Leu Gly Arg Thr Ile			
325	330	335	
Tyr Gln Val Leu Thr Asp Ile Trp Leu Lys Lys Glu Asp Ser Lys Phe			
340	345	350	
Leu Gly Ser Phe Arg Ser Phe Lys Leu Thr Asn Pro Ala Asn Ala Thr			
355	360	365	
Val Tyr Lys Gly Ile Ser Asp Asp Phe Val Gly Val Ser Asn Ser Thr			
370	375	380	
Val Ala Asp Ala Asp Lys Val Lys Ala Gln Glu Phe Leu Asn Glu Ala			
385	390	395	400
Thr Ala Asp Phe Lys Lys Gln Ile Gln Ala Asn Pro Thr Asn Tyr Lys			
405	410	415	
Ser Val Leu Gly Ile Pro Thr Met Leu Ile Asn Asp Asn Asp Ala Lys			
420	425	430	
Asp Asn Glu Lys Ala Ser Leu Phe His Phe Asp Asn Trp Gln Thr Tyr			
435	440	445	
Trp Ala Phe His Ser Arg Phe Ile Asn			
450	455		

58

### 【図面の簡単な説明】

\* 2つのタンパク質は36.2%のアミノ酸同一性を共有す

【図1】M. hyopneumoniaeからのMhp3(配列番号2)および初めはM. argininiから生じると考えられたが、しかし後にM. hyorhinisから得られることが示されたAg234-5(配列番号4)間のClustal W(1.7)配列アライメント。アミノ酸配列同一性は、星印(\*)で図示され、高度保存的置換はコロン(:)で示され、そして保存的置換はピリオド(.)で示されている。全体的に、\*

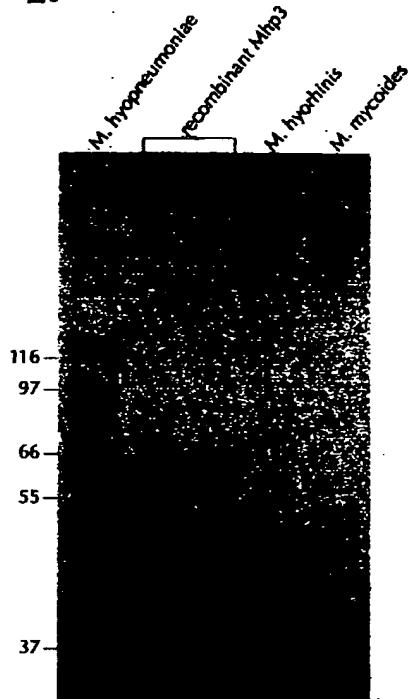
【図2】*M. hyopneumoniae*、*M. hyorhinis*または*M. mycoides*からのタンパク質抽出物に対する、あるいは精製粗換えMhp3に対する、*M. hyopneumoniae*を用いた実験的試験ブタからの抗体の反応性を実証するウエスタンプロット。

【图1】

Mmp3 Ag234-5	MKKKIKKNNPFLGLVWVPLSAIATISAGCWDEKETTKEEKSADNQINQKQITDWSKISGLVME --MFVKKSLFLPFTGTITSTVAVSVATPFW-CG--ETDKEGK----IIRIFDNPSPVK--D-	60 46
Mmp3 Ag234-5	RKSKKIMAAKADANKEPGLNNAIVTDAGGTVDNNSPQNSWNEAIQ----QLGALCQEGETSV RQ----AETEAKAIFDFPNTVLLTAGGTVQDJKSFNSQSIWEAVLEHYDQEETKTMILDRVSQ	116 101
Mmp3 Ag234-5	DSS-TAERLEGKYYSSLATPTNNVVWLSGPQHGDPTTQWKLKEP-EHQ----LPTERKILIL ETNMMSEELIGKYNPLANGKRNWVLLTSGPQGQEQEPKPLKDTDSGKKSYSULLAKRKVIV	170 161
Mmp3 Ag234-5	GIDWDTD----E8VLPTEGKYLNLTKYKTEBAGMAGAYANASPLAKKPPSDPTKRSAlVIGGG AVNDLNSKEDPDLIUGKHTSILYKTEBAGTFLAGTASKPLAYKTPDRAKRTTAPGCGC	227 221
Mmp3 Ag234-5	ISPAVTDIFLACYLACITKANGLKGSISDRKTITTTDQLEIINLGPFDVQDGTSTKERLEQIASKIK HGAGVTDIFLAGFLAGIAYKNNEDPTAKVTSIISMMINLUTCPGPISENK-TATYINGIVNKS-	287 279
Mmp3 Ag234-5	PSTLLAVAGPI/TIIFSDTLLAQSD----RVLIGVQDQDSLVYTTKTKNPPPTSLRKILGCVSP -SLVLPVAGSLTSVVDALIKKSHDITKYLIGVQDPTDOSKIPSPAT-VPPFTSIEQHLGRTY	345 337
Mmp3 Ag234-5	SVLSDOLYTAKSNSSEHLAGP/KGKKS----ATVLYLGKIDRFDVIAIDTSLBEGNDKLATEAI QVLTDIWLKKEDSKPLGSFRSPFELTNPAMATVYKGISIDEPVGVSNTVADADKVKQAEPL	401 397
Mmp3 Ag234-5	SEAKKEPEKTTITPAEERVKYTLIPEMPDQKDFQDQKQESLSDKLITLIDNK----- NEATADPFRQKIQNAPNTN-YKSVLCPITMLIUNODAKDKEKASLPEPNNQTYWPHSRPI	451 456
Mmp3 Ag234-5	N 457	

【図2】

図2



## フロントページの続き

(51) Int. Cl. 7	識別記号	F I	テマコード(参考)
A 6 1 P 31/04	171	C 0 7 K 14/30	4 C 0 8 5
C 0 7 K 14/30		19/00	4 H 0 4 5
19/00		C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 1/21		C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 P 21/02		C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/68		G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53		33/566	M
33/566		33/569	F
33/569		C 1 2 R 1:19	
//(C 1 2 P 21/02		C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 1 2 R 1:19)			

(72)発明者 レベッカ アン マドゥーラ

アメリカ合衆国, コネチカット 06340,  
 グロートン, イースタン ポイント ロー  
 ド, ファイザー セントラル リサーチ

(72)発明者 イブレット リー ロージー

アメリカ合衆国, コネチカット 06340,  
 グロートン, イースタン ポイント ロー  
 ド, ファイザー セントラル リサーチ

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA13 BA31 CA01 CA03  
CA09 DA06 EA04 GA11 GA19  
HA14  
4B063 QA01 QA07 QA18 QA19 QQ03  
QQ06 QQ42 QQ52 QQ58 QR32  
QR55 QS10 QS16 QS25 QS34  
QX02  
4B064 AG01 AG31 CA02 CA19 CC24  
CE06 CE11 DA01 DA15  
4B065 AA26X AA37Y AB01 BA02  
BD15 BD17 CA24 CA43 CA46  
4C084 AA01 AA02 AA13 BA01 BA08  
BA19 BA20 BA21 BA22 CA04  
CA21 CA53 ZB351 ZC541  
ZC611  
4C085 AA03 BA48 BB11 CC07 CC21  
DD62 EE01 EE05 FF02 FF14  
FF17  
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10  
BA41 CA11 EA20 EA29 FA74  
GA10 GA23